

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. Februar 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/011907 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 14/705**

97084 Würzburg (DE). **HENSEL, Frank** [DE/DE]; Am  
Exerzierplatz 1, 97070 Würzburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02699

(74) **Anwalt: PÖHNER, Wilfried**; Röntgenring 4, Postfach 63  
23, 97070 Würzburg (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Juli 2002 (23.07.2002)

(81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AU, CA, CN, IL, JP, RU,  
US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: europäisches Patent (AT,  
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 36 009.6 24. Juli 2001 (24.07.2001) DE  
102 10 425.5 9. März 2002 (09.03.2002) DE

**Veröffentlicht:**  
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(71) Anmelder und

(72) **Erfinder: MÜLLER-HERMELINK, Hans, Konrad**  
[DE/DE]; Heinrich-Zeuner-Strasse 72, 97082 Würzburg  
(DE). **VOLLMERS, Heinz** [DE/DE]; Budapeststrasse 23,

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*



**WO 03/011907 A2**

(54) **Title:** RECEPTOR, THE USE THEREOF, AND MOUSE ANTIBODIES

(54) **Bezeichnung:** REZEPTOR, DESSEN VERWENDUNG SOWIE MAUSANTIKÖRPER

(57) **Abstract:** The invention relates to a receptor located on the surface membrane of highly proliferative cells, particularly of the gastric carcinoma, which is composed of glycoproteins. At least one determinant of the glycoprotein corresponds with one of the CFR-1 protein, and the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 (IgM) specifically binds to the glycoprotein.

(57) **Zusammenfassung:** Rezeptor auf der Oberflächenmembran von stark proliferierenden Zellen insbesondere des Magenkarzinoms, der aus Glykoproteinen aufgebaut ist, wobei wenigstens eine Determinante des Glykoproteins mit einer des CFR-1 Proteins übereinstimmt und der humane Antikörper 103/51 und/oder der murine Antikörper 58/47-69 (IgM) am Glykoprotein spezifisch bindet.

### Rezeptor, dessen Verwendung sowie Mausantikörper

5 Die Erfindung bezieht sich auf einen an der Oberfläche von stark proliferierenden Zellen insbesondere des Magenkarzinoms befindlichen Rezeptor, dessen Verwendung, sowie die Struktur eines spezifisch hieran bindenden Mausantikörpers.

10 Weithin bekannt ist, für klinische und wissenschaftliche Untersuchungen von Hybridomen erzeugte monoklonale Antikörper einzusetzen. Für die Behandlung von Tumoren, viralen und mikrobiellen Infektionen, B-Zell-Immundefizienzen mit verringerter Antikörpererzeugung und andere Störungen des Immunsystems ist die Anwendung humaner monoklonaler, von B-Zell Hybridomen erzeugter Antikörper vielversprechend.

20 Beim Magenkarzinom handelt es sich um eine der weltweit häufigsten Krebsarten. Nach Lauren „The two histological man types of gastric carcinoma“, Acta Path Microbiol Scand; 64:331-49, werden sie histologisch eingeteilt in diffuse Adenokarzinome und intestinale Adenokarzinome. Intestinale Magenkarzinome sind oft von chronischer Gastritis B begleitet und insbesondere von intestinalen Metaplasien, die als Vorläufer dysplastischer Veränderungen und von Magenkarzinomen betrachtet werden. Unterschiede zwischen diesen

25 beiden Arten zeigen sich auch darin, dass Patienten mit Karzinomen des diffusen Typs oft der Blutgruppe A angehören, woraus auf den Einfluss genetischer Faktoren beim Krebsrisiko geschlossen werden kann, während Umweltfaktoren, z.B. eine Helicobacter pylori-Infektion, möglicherweise für die Entstehung von Karzinomen des intestinalen

30 Typs von Bedeutung sind. Zwar ist eine abnehmende Häufigkeit der Magenadenokarzinome im Westen festzustellen, dafür treten sie aber nun vermehrt im Osten auf.

Die Entwicklung von Magenkrebs ist ein mehrstufiger und multifaktorieller Prozeß (Correa, 1992 Cancer Res. 52:6735-6740). Obwohl nur wenig über die molekularen Mechanismen bekannt gelten als Faktoren hohe Salzeinnahmen, Alkohol, Nitrosamine und Infektionen mit dem Bakterium *Helicobacter Pylori* (*H. pylori*) als nachweislich am Entstehen des Magenkrebses beteiligt. Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen *H. pylori* Infektionen und dem Vorkommen von Gastritis dysplasi und der Entwicklung von Magenkrebs wurde dieses Bakterium durch die WHO als in die Klasse 1 der kanzerogenen Stoffe gehörend klassifiziert. *H. pylori* induziert direkt schwerwiegende vorkanzerogene Änderungen der Zellen im Bereich der Schleimhaut und ist ebenfalls verantwortlich für ein Ansteigen der Autoantikörper, die häufig bei Gastritis und Magenkrebspatienten beobachtet werden (Negrini et al., 1996 Gastroenterol. 111:655-665). Diese Antikörper sind in der Lage, Magenlasionen und Apoptose im Magenepithel zu induzieren (Steiniger et al., 1998 Virchows Arch. 433:13-18). Die Natur der Antigene ist teilweise bis heute unbekannt. Antikörper gegen die Magen H+/K(+)-ATPase (Claeys et al., 1998 Gastroenterology 115:340-347), Interleukin-8 (Crabtree et al., 1993 Scand.J.Immunol. 37:65-70; Ma et al., 1994 Scand.J.Gastroenterol. 29:961-965) und das Lewisblutgruppenantigen (Appelmelk et al., 1997 Trends.Microbiol. 5:70-73) werden häufig bei Magenschleimhaut oder Magenkrebs gefunden.

Die Therapie war bislang auf Gastrektomie und Lymphadenektomie beschränkt, aufgrund der auch dann noch schlechten Prognose besteht jedoch der Bedarf nach einer neuen begleitenden Therapie. Immunologische Studien haben gezeigt, dass auch in Fällen, in denen das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann, eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar ist, aber nicht ausreicht, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein wirkungsvoller An-

5 satz ist nun der, von der Immunantwort des Patienten stammenden Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und therapeutisch einzusetzen. So wurden bsp. von Patienten mit Lungen-, Ösophagus- und Dickdarmkrebs stammende Antikörper isoliert und davon humane monoklonale Antikörper abgeleitet, die z.B. direkt Differenzierung und das Wachstum der Tumorzellen beeinflussen.

10 Apoptose ist der programmierte Zelltod, Selbstmord von Zellen, durch Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern. Apoptose, die physiologische Form des Zelltods, garantiert eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebeverletzungen auszulösen wie im Falle  
15 der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient sie auch zum Entfernen maligner Zellen, wie etwa Krebsvorläuferzellen. Sie kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glukokortikoide und Antikörper. Sie ist die häufigste Todesursache  
20 eukaryontischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie werden prädominant auf Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen, weshalb sie sich nicht für eine Krebstherapie eignen. Insbesondere haben bei in-vivo-Tests Liganden und Anti-  
25 körper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt. Deshalb sind tumorspezifische Rezeptoren mit apoptotischer Funktion besonders wichtig.

30 In jüngsten Publikationen wurde der humane Antikörper 103/51 beschrieben, der von Magenkrebspatienten mit diffusem Adenokarzinom gewonnen wurde und der mit H. pylori und Magenkrebszellen

wechselwirkt (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532). Bei allen Untersuchungen wurde die bekannte Magenadenokarzinom-Zelllinie 23132 verwendet, die unter der Nr. ACC201 bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig hinterlegt ist. Der Antikörper hat in geringen Dosen einen mitotischen Effekt auf Magenkrebszellen in vitro, in dem sie an einen 130 kD Membranrezeptor binden (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235). Durch Sequenzierung der Genbereiche des Antikörpers wurde der Antikörper 103/51 als Autoantikörper identifiziert. Immunohistochemische Untersuchungen zeigen, daß der Antikörper stark mit Magenkrebszellen und mit Magenhormonzellen reagiert.

Der zelluläre Rezeptor des monoklonalen Antikörpers 103/51 war bisher nicht bekannt. Im Rahmen der zu vorliegenden Erfindung führenden Untersuchungen konnte dieser zelluläre Rezeptor identifiziert werden: Diese Identifizierung gestaltete sich jedoch als schwierig. Einerseits reagiert der monoklonale Antikörper 103/51 bei der Westernblot-Analyse mit seinem Rezeptor nur unter ganz bestimmten Stringenzbedingungen. Andererseits findet man eine durch Denaturierungsartefakte hervorgerufene unspezifische Reaktion mit einer Reihe weiterer Proteine.

Sequenzierungen haben gezeigt, daß der Rezeptor Übereinstimmungen mit dem CFR-1 Protein aufweist, jedoch mit diesem nicht identisch ist. Des weiteren werden damit Glycoprotein-Verbindungen beansprucht, die in einer oder mehreren Determinanten (Liganden) mit denen des bekannten CFR-1 übereinstimmen. Insbesondere wird eine Homologie gefordert, die im Sinne dieser Anmeldung als eine Übereinstimmung von mindestens 80% in den primären Aminosäuresequenzen zu definieren ist. Der Rezeptor ist demzufolge eine Isoform zu CFR-1. Zusätzlich ist eine spezifische Bindung entweder an

den humanen Antikörper 103/51 und/oder den murinen Antikörper 58/47-69 gefordert.

5 Von besonderem Interesse ist, wenn die spezifische Bindungsstelle am Glykoprotein ein Carbohydrat-Rest, also ein Zucker-Rest ist.

In spezieller Ausgestaltung weist das CFR-1 Protein als Determinante eine Aminosäuresequenz gemäß Anlage S Zelllinie 23132 auf.

10 Bei dem zellulären Rezeptor des Antikörpers 103/51 handelt es sich um eine für Tumorzellen, insbesondere für Magenkarzinomzellen spezifische Isoform des Proteins CFR-1, die in normalen Gewebe nicht auftritt. Die spezifischen Rezeptoreigenschaften dieser Isoform  
15 beruhen auf einer besonderen mit dem Proteinrückgrat über eine N-Verknüpfung verbundenen Glykostruktur. Die tumorspezifische Rezeptor kann in einem Screeningverfahren zur Identifizierung von spezifischen Bindepartnern eingesetzt werden. Spezifischer Bindepartner an den Rezeptor sind im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Substanzen, die selektiv an eine tumorspezifische Glyko-  
20 struktur von CFR-1 binden und vorzugsweise die Fähigkeit zur Apoptoseinduzierung besitzen. Diese spezifischen Bindepartner können für die Herstellung von therapeutischen Mitteln zur Tumorkämpfung sowie zur Herstellung von diagnostischen Mitteln eingesetzt werden.

25 Die Proteinverbindung wurde als Isoform des CFR-1 durch Reinigung, Sequenzierung und Transfektion bestimmt. Die Spezifität für das Antigen 103/51 wird durch Herstellung muriner Antikörper aus gereinigten Molekülen mit identischen Reaktionen und Funktionen  
30 bestätigt, durch immunhistochemisches Färben und einer MTT-Untersuchung von zwei CFR-1 negativen Zelllinien. Die Isoform des CFR-1 Moleküls, welches sowohl durch den humanen als auch den

murinen Antikörper festgestellt wurde, ist in den Zellmembranen der Epithelzellen lokalisiert und hat ein Expressionsmuster, das sich von den bisher für CFR-1 beschriebenen unterscheidet (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609).

5

Das CFR-1, welches aus hochaffinen FGF Bindeprotein (FGF=fibroblast growth factor) aus Hühnerfibroblasten isoliert wurde (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609), bindet in einer größeren Anzahl an FGFs und dürfte eine Rolle spielen bei der Regulierung der Zellproliferation. In Eizellen chinesischer Hamster (CHO) wurde CFR-1 im Golgi-Apparat (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609) gefunden, aber es kann ebenso in einer mutierten Form ausgeschieden werden (Zuber et al. 1997 J.Cell Physiol. 170:217-227). In Abhängigkeit vom Organismus wurden zwei Varianten des CFR-1 festgestellt, die Homologien zwischen 80 und 95% mit ESL-1 (= E-selectin-ligand 1) und MG-160 (Membransialoglykoprotein 160) aufweisen (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609; Stieber et al., 1995 Exp.Cell.Res. 219:562-570; Steegmaier et al., 1995 Nature 373:615-620; Mourelatos et al., 1996 DNA Cell.Biol. 15:1121-1128) und scheinen keine weiteren Sequenzhomologien mit anderen, soweit bekannten Proteinen aufzuweisen. Die Funktion und der zelluläre Aufbau der CFR-1 und deren Homologen ist relativ unbekannt und widersprüchlich. Es konnte gezeigt werden, daß MG-160, welches ein mittleres Golgi sialoglycoprotein dargestellt und aus Rattenhirn gewonnen wurde, eine Rolle im intrazellulären FGF Austausch spielt (Zuber et al., 1997 J.Cell.Physiol. 170:217-227).

25

30

Jüngste Resultate haben gezeigt, daß die Lokalisierung dieses Proteins nicht auf den Golgi Apparat beschränkt ist. Dann jedoch, wenn es am c-terminus abgeschnitten ist, kann das Protein an der Plasmamembran und den Filopodia lokalisiert sein (Gonatas et al., 1998 J.Cell.Sci. 111:249-260). Dies stimmt überein mit der Kenntnis, daß

das dritte Homologe, ESL-1, welches aus mausneutrophilen Progenitorzellen isoliert wurde (32Dcl3), sowohl im Golgi-Apparat als auch an der Zelloberfläche von microvilli gefunden wurde (Steegmaier et al., 1997 J.Cell.Sci. 110:687-694; Gonatas et al., 1998 J.Cell.Sci. 111:249-260). ESL-1 wurde als Ligand von E-selectin in neutrophilen Zellen mit einem ungefähren Molekulargewicht von 150 kD identifiziert. Immunpräzipitation mit Anti ESL-1 Antikörpern zeigen, daß eine nicht näher definierte Isoform dieses Proteins aus verschiedenen Zellen ausgefällt werden können, einschließlich einiger Krebszelllinien (Steegmaier et al., 1995 Nature 373:615-620).

Aufgrund der überwiegend in den Membranen von Krebszellen liegenden Vorkommen des CFR-1, ist der Schluß zu ziehen, daß der beschriebene Rezeptor eine Isoform des CFR-1 ist. Eine abweichende Zellverteilung von CFR-1 und seiner Homologe ist wahrscheinlich für die oben genannten Resultate verantwortlich und ist ein bekanntes Phänomen für andere Proteine (Smalheiser, 1996 Mol.Biol.Cell 7:1003-1014). Eine abweichende Verteilung kann durch ein abweichendes Glycosilierungsmuster in malignen Zellen verursacht werden, die zu einem Transport zu den Plasmamembranen führen.

Die Gewebeverteilung zeigt, daß das CFR-1 Molekül mit aktivierten und proliferierenden Zellen in Verbindung steht, wie durch Anfärben mit dem Antikörper Ki67 gezeigt wurde (Ramires et al., 1997 J.Pathol 182:62-67). Die normale Magenschleimhaut zeigt diesen Rezeptor nicht in meßbarem Umfang, aber die mit H. pylori infiltrierte Epithelien oder displastische Epithelien weisen dieses Antigen auf. Beide Gewebe sind proliferativ und können Vorgänge für den Magenkrebs sein.

Für das Verständnis der hohen Wirksamkeit entscheidend ist, daß sich im Gegensatz zur Struktur des CFR-1, die sich auch auf gesun-



den Zellen findet, die ermittelte Isoform sich nicht auf gesunden sondern ausschließlich auf stark proliferierenden Zellen findet, Zellen also, die sich stark teilen, wie beispielsweise die im Wachstum befindlichen Tumorzellen sowie entsprechender Vorläuferstufen. Die

5 Wirkungsweise des Rezeptors beruht im wesentlichen darauf, daß er als Energierezeptor der Nahrungsaufnahme der Zellen dient und insbesondere bei Zellen mit häufiger Teilung, zu denen die Karzinomzellen zählen, einen dominierenden Anteil aufweisen. Ausdrücklich anzumerken ist, daß dieser Rezeptor nicht nur bei Magenkarzinomen

10 Anwendung finden wird, sondern auch bei allen epithelialen Tumoren, die im wesentlichen gleiche Reaktionsmechanismen aufweisen. Hinausgehend über Magentumore wurde die Existenz dieser Rezeptoren in kanzerogenen Gewebe folgender Tumore nachgewiesen: Speiseröhre, Magen, Darm, Rektum, Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Bronchien, Brust, Cervix, Prostata, Cardia, Barrett,

15 Eierstock und/oder Uterus. Die tumorwirksamen Antikörper, die an den erfindungsgemäßen Rezeptor andocken, wirken also gezielt wirksam an den kanzerogenen (und nicht den gesunden) Zellen.

20 Die Glycoproteine der Rezeptorstruktur können über deren Molekulargewicht von etwa 130 kD identifiziert werden, wobei sich das Molekulargewicht in einer der bekannten Weise, so z. B. mittels der Gelelektrophorese ermittelt werden kann. Der Begriff „etwa“ bezieht sich darauf, daß für einen Fachmann erkennbar ist, daß derartige

25 Größenbestimmungen keinesfalls exakt sind, sondern Veränderungen oder Variationen der Methoden der Molekulargrößenbestimmungen zu Schwankungen in der Meßwerten führen.

30 Das bedeutendste Anwendungsgebiet des Rezeptors ist das der Diagnose und Therapie. Bei der prophylaktischen Anwendung wird der Rezeptor dem Patienten in pharmazeutischen Dosen verabreicht, mit dem Ziel der Stimulierung von Antikörpern, so daß sich im Er-

gebnis eine Vaccinierung mit Hilfe des Rezeptors erreichen läßt. Die Antikörper tragen Sorge dafür, etwaig entstehende Tumorzellen zu beseitigen.

- 5 Aber auch die Verabreichung des Rezeptors bei bereits vorhandenen Tumorzellen ist eine Möglichkeit der Medikation. Die verabreichten Rezeptoren unterstützen und verstärken die Antikörperbildung und sorgen folglich für eine erhöhte Apoptose der Tumorzellen oder für eine komplementvermittelte Lyse. Die Zelle „verhungert“, da eine
- 10 Blockierung des Rezeptors zu einem Wachstumsstillstand führt.

- Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich der Rezeptor insbesondere zur Bekämpfung der nachfolgend genannten Tumorstufen nachweislich eignet. Im Hinblick auf die Erkrankungen des Magens eignet sich der Rezeptor zur Bekämpfung der
- 15 Dysplasie der Magenschleimhaut und/oder der intestinalen Metaplasie des Magens und/oder der Bekämpfung einer Magenschleimhautentzündung, die mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* assoziiert ist sowie zur Bekämpfung tubulärer und tubulovillöser Adenome des
- 20 Magens.

- Eine Anwendung ist insbesondere auch bei folgenden Erkrankungen des Dickdarms angezeigt, nämlich der tubulären Adenome des Dickdarms, der villösen Adenome des Dickdarms und der Dysplasie bei
- 25 Collitis ulcerosa.

- Der Rezeptor ist gleichermaßen geeignet bei Barrett-Dysplasie und der Barrett-Metaplasie der Speiseröhre.

- Auch zur Bekämpfung der nachfolgend genannten Erkrankungen des Gebärmutterhalses ist der Rezeptor geeignet:

- Der cervicalen intraepithelialen Neoplasie I, der cervicalen intraepithelialen Neoplasie II und der cervicalen intraepithelialen Neoplasie III.
- 30

Schließlich eignet sich der vorbeschriebene Rezeptor auch zur Anwendung bei Plattenepithel Metaplasie und Plattenepithel Dysplasie des Bronchus.

- 5            Aufgrund der vorbeschriebenen Wirkmechanismen eignet sich der Rezeptor grundsätzlich zur Bekämpfung von Tumoren der Speiseröhre, des Magens, Darms, der Rektums, der Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Bronchien, Brust, Cervix, Prostata, Cardia, Barrett, Eierstock und/oder Uterus.
- 10           Die Verwendung des Rezeptors zu Diagnosezwecke nutzt die Binde-fähigkeit der Antikörper an diesem Rezeptor aufgrund der spezifi-schen Antigen/Antikörper-Wechselwirkung. Auf diese Weise läßt sich über die Bindungsfähigkeit an den Rezeptor ein Nachweis für die
- 15           Existenz, die Lokalisierung und/oder die Menge der entsprechenden Antikörper führen. Nach den gleichen Reaktionsmechanismen ist über die Binde-fähigkeit ein Nachweis des Rezeptors möglich.
- 20           Insbesondere dann, wenn die Antikörper Tumorantikörper sind, kön-nen sie zum Nachweis für die Existenz von Tumoren genutzt werden. Insbesondere ist es möglich, den Rezeptor als Tumormarker zu nut-zen.
- 25           In einer Weiterbildung kann der Rezeptor zur Herstellung eines An-titumormittels genutzt werden, in dem potentiell antitumorwirksame Substanzen auf ihre spezifische Binde-fähigkeit an den Rezeptor un-tersucht werden und bei positiven Ergebnis, d.h. bei Eingehen einer Bindung, diese Substanz für die pharmazeutische Anwendung ge-nutzt wird. Selbstverständlich ist eine entsprechende Konfektionie-rung und die Beigabe üblicher Zuschlagsstoffe zur Herstellung des in
- 30           den Verkehr gelangenden Pharmazeutikums in der üblichen Weise erforderlich.

5 Ausdrücklich klarzustellen bleibt, daß für die Herstellung von Antitumorarzneien unter Zuhilfenahme des Rezeptors im vorbeschriebenen Sinne nicht nur humane Antikörper in Frage kommen, sondern auch Mausantikörper und/oder humanisierte Antikörper beliebiger Spezies. Gleichermäßen gilt dies für Antikörperfragmente wie z. B. Fab und F(ab)<sub>2</sub> und/oder Fab'-Fragmente, wie sie durch die proteolytische Spaltung von Antikörpern erhalten werden. Hierzu zählen  
10 weiterhin Einzelstrangantikörper und/oder tetramere und/oder dimere Antikörperform und/oder bispezifische Antikörper.

Weiterhin ist bekannt, dass humane Tumorantigene, die in Mäusen immunogen sind, zur Erzeugung monoklonaler Mausantikörpern verwendet werden, und die in der Lage sind, das humane Antigen  
15 spezifisch zu erkennen und deshalb geeignet sind, bei Menschen therapeutisch verwendet zu werden.

Aufgabe der zugrundeliegenden Erfindung ist die Ermittlung der Receptorstruktur sowie deren Verwendung. Allerdings ergibt sich das  
20 Problem, dass die wiederholte Injektion von „fremden“ Antikörpern bsp. Mausantikörpern in Menschen sowohl zu nachteiligen Hypersensibilitätsreaktion sowie erhöhten Clearance-Rate der zirkulierenden Antikörpern führen, sodass die Antikörper ihre Zielstelle nicht erreichen.

25 Aus diesen Gründen bedarf es eine Überprüfung der therapeutischen Verwendbarkeit von Mausantikörpern. Dessen ungeachtet ist die Verwendbarkeit im Zusammenhang mit diagnostischen Verfahren uneingeschränkt. Auch besteht die Möglichkeit, humanisierte  
30 Mausantikörper abzuleiten und zu therapeutischen Zwecken zu nutzen. Auch hier ist entscheidend, daß nicht nur die bereits vorliegen-

den Tumore sondern auch präkanzerogene Strukturen mit Hilfe dieser Diagnoseverfahren ermittelbar sind.

5 Neben dem vorbeschriebenen Rezeptor wird weiterhin Schutz beansprucht für einen spezifisch hieran bindenden Mausantikörper, dessen Struktur durch die Anlagen A, B definiert ist. Die für alle Antikörper identischen Regionen wurden nicht wiedergegeben; beansprucht und dargestellt wurden jene für den individuellen Antikörper charakteristischen Regionen.

10

Im Ergebnis erlaubt es der in seiner Struktur beschriebene Rezeptor, der als Isoform zu CFR-1 zu bezeichnen ist, eine Therapie und Diagnose nicht nur von Tumoren sondern auch präkanzerogene Strukturen. Darüber hinaus wird ein spezifischer hieran bindender Mausantikörper in seiner Struktur beschrieben.

15

20

## Materialien und Methoden

### Zellkultur und Antikörperreinigung

25 Für alle Untersuchungen wurde die bekannte Magenadenokarzinom-Zelllinie 23132 (Hensel et al. 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) verwendet. Die Zellen wurden bis zu 80% Konfluenz in RPMI-1640 (PAA, Wien Österreich) ergänzt mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (1% für beide) gezüchtet. Für die beschriebenen Untersuchungen  
30 wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA getrennt und zweifach mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) vor Benutzung gewaschen.

Die menschliche Hybridomazelllinie 103/51 wurde gewonnen und  
gezüchtet wie beschrieben in Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-  
1532. Die Reinigung der IgM Antikörper wurde in der Weise vorge-  
nommen wie anderweitig bereits beschrieben (Vollmers et al., 1998  
5 Oncol.Rep. 5:549-552).

### **Präparation von Membranauszügen**

10 Die Isolierung der Membranproteine aus Tumorzellen wurde in der  
Weise, wie sie durch Hensel et al. (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer  
81:229-235) beschrieben wurde, unter Benutzung der Zelllinie 23132  
durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die zusammenhän-  
genden Tumorzellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zell-  
15 schaber abgelöst und zentrifugiert, und in einem hypotonischen Puf-  
fer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>) aufgelöst. Nach einer 15  
Min. Inkubationszeit auf Eis und einer Ultraschallbehandlung für 5  
Min., wurden die Kerne durch Zentrifugieren bei 10.000 g für eine  
Dauer von 10 Min. pelletiert. Das Supernatant wurde für 30 Min. bei  
20 100.000 g in einem Swing-out rotor zentrifugiert und hierdurch die  
Membran pelletiert. Nachdem die Pellets mit dem hypotonischen  
Puffer gewaschen wurde, wurden sie in einen Membran Lysis Puffer  
(50 mM HEPES pH 7.4, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol, and 1% Triton  
X-100) erneut aufgelöst. Ein Protease Inhibitor (Boehringer, Mann-  
25 heim, Deutschland) wurde allen Lösungen zugeben.

### **Western blotting:**

30 Die Auftrennung durch 10 %ige SDS-PAGE Gele und Western blot-  
ting der Proteine wurden unter Standardbedingungen, wie anderwei-  
tig beschrieben (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235),

durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die geblotteten Nitro-  
zellulose -Membrane mit PBS blockiert, welches 2 % Magermilchpul-  
ver enthielt, dem eine einstündigen Inkubation mit 10 µg/ml gerei-  
nigtem Antikörper 103/51 folgte. Nach dreimaligem Waschen mit  
5 PBS + 0,05% Tween-20 wurde der zweite Antikörper (Peroxidase  
gekoppelte Hasen antihumane IgM Antikörper (Dianova, Hamburg,  
Deutschland)) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des Supersi-  
gnal Chemilumineszenz kits von Pierce (KMF, St. Augustin,  
Deutschland) nachgewiesen.

10

#### 15 Reinigung des Antigen 103/51

Die Reinigung des Antigens wurde mit Säulenchromatographie unter  
Verwendung einer Pharmazia (Freiburg, Deutschland) FPLC Einheit  
durchgeführt. Für die Größenausschluß-Chromatographie wurde ei-  
20 ne Pharmazia Superdex 200 (XK 16/60) Säule mit 5 mg des Mem-  
branpräparates geladen und mit einem Puffer A betrieben (100 mM  
Tris/Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 40mM NaCl, 1% Triton X-100). Dann  
wurde das Eluat fraktioniert und durch Western blot Analyse auf Re-  
aktionen mit Antikörpern 103/51 untersucht. Die positiven Fraktionen  
25 wurden auf einer MonoQ (5/5 Säule) unter Verwendung des Puffers  
A gegeben. Die gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines linearen  
Gradienten unter Verwendung des Puffers B (100 mM Tris/ Cl, pH  
7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% Triton X-100) ausgewa-  
schen, fraktioniert und mit Coomassiegefärbtem SDS-PAGE and  
30 Western blot Analyse untersucht. Die positiven Banden wurden aus  
dem Gel getrennt und sequenziert oder zur Immunisierung von Mäu-  
sen genutzt.

### **MALDI peptide Aufzeichnung**

5 Die interessierenden Banden wurden herausgetrennt und in kleine  
Stücke von etwa 1mm x 1mm zerschnitten. Die Gelstücke wurden  
gewaschen, mit DTT reduziert, S-Alkyliert mit Iodoacetamid und In-  
Gel aufgelöst mit Trypsin (unmodifiziert, Sequenzgrad, Boehringer)  
wie anderweitig beschrieben (Shevchenko et al., 1996b Anal.Chem.  
10 68:850-858). Nach 3 Stunden der Verdauung bei 37°C wurden 0.3 µl  
der Lösung entfernt und einer MALDI peptid Massenspektrometrie  
auf einem Bruker Reflex MALDI-TOF unterzogen, welches mit einer  
nachträglichen Extraktion (Brucker, Franzen, Bremen, Deutschland)  
ausgerüstet war. Die Dünnschichttechnik wurde zur Probenpräparierung  
15 angewendet (Jensen et al., 1996 Rapid.Communicat.Mass.Spectrom  
10:1371-1378). Die tryptischen Peptid-Massen wurden dazu verwen-  
det, um nicht redundante Proteinsequenzdaten durch ein Peptid-  
Suchprogramm, das im Hause entwickelt wurde, zu suchen.

20

### **Klonen des CFR-1 Antisense-Vektor und Transfektion**

RNA Isolierung, cDNA Synthese und PCR wurden wie beschrieben  
(Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt. Verkürzt  
25 wiedergegeben wurde für die Amplifikation von PCR aus einem 897  
bp Fragment aus einem Bereich von 802 bis 1699 Basenpaare fol-  
gende Primer benutzt: CFR-für 5'  
GCTTGGAGAAAGGCCTGGTGAA 3', CFR-Rev 5'  
TGGAAGTTGCGGTACAGGACAG 3'. Die Amplifikation wurde mit  
30 folgendem Zyklusprofil durchgeführt: 95°C, 2 Min; nachfolgend 35  
Zyklen bei 94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C 60 sec. und abschlie-  
ßend 72 °C, 4 min. Die Klonierung in den pCR- Skript Amp SK (+)



Vektor und das Sequenzieren der DNA wurde wie früher schon beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt. Der Insert wurde in den pHook-2 Vektor (Invitrogen, Leek, Niederlande) subkloniert und das Klonen wurde erneut durch Sequenzierung überprüft.

Die Transfektion der Zelllinie 23132 mit pHook2-anti CFR-1 wurde mit einem Primefaktor Reagenz (PQLab, Erlangen, Germany) entsprechend dem Lieferantenhandbuch vervollständigt. In Kürze, dass Plasmid DNA wurde auf 10 µg/ml verdünnt und das Primefaktorreagenz im Verhältnis 1:10 einem serumfreien Wachstumsmedium beigegeben. Die verdünnte Plasmid DNA ( 450 µl), das verdünnte Primefaktorreagenz ergänzend (90 µl) und das serumfreie Wachstumsmedium (460 µl) wurden vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. 60 ml Zellkulturschalen (70% konfluent) wurden zweimal mit dem serumfreien Wachstumsmedium gewaschen und anschließend die Primefaktor/DNA-Mischung tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden inkubiert für 18 Stunden bei 37°C and 7% CO<sub>2</sub>, anschließend wurde das serumfreie Wachstumsmedium ersetzt durch ein Wachstumsmedium mit 10% FCS und die Zellen wurden weitere 24 Stunden inkubiert, bevor die Expression der CFR-1 Struktur untersucht wurde.

### **Durchflusszytometrie**

Die Zelllinie 23132 wurde von den Kulturplatten durch Trypsin /EDTA 48 Stunden nach der Transfektion abgelöst, gewaschen und anschließend auf Eis mit dem Antikörper 103/51 oder dem humanen Isotyp-kontrol Antikörper (Chromopure human IgM) für 15 min. inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem FITC-gekoppelte Hasen Anti-Human IgM Antikörper (Dianova) für 15 Min. auf Eis. Die Antikörper wurden optimal in der 0,01% Natriumazid PBS enthalten ver-

dünnt. Die Zellen wurden mit Durchflusszytometrie (FACScan; Becton Dickinson, USA) analysiert.

5

### **Glycosidaseassays**

10

Abgelöste und gewaschene Zellen werden erneut in RPMI-1640, welches 10% FCS enthält, suspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert, anschließend gezählt und die Cytospins präpariert. Nach Lufttrocknung, Acetonfixierungen der Cytospins Präparate (10 Min), gewaschen, inkubiert mit 20 µU/ml O-Glycosidase oder 5 mU/ml N-Glycosidase (Boehringer) für 4 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und immunhistochemisch gefärbt.

15

20

Für die Deglycosylation der Membran-Proteine wurden die Membranextrakte für 16 Stunden bei 37°C mit 1 mU/ml N-Glycosidase, verdünnt in Deglycosylation Puffer (50 mM POO-Buffer, pH 7,4) inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Extrakte mit Deglycosylation Puffer allein inkubiert. Dann wurden die Extrakte durch SDS-PAGE separiert und die Western blots, wie oben beschrieben, durchgeführt.

25

### **Herstellung murine monoklonaler Antikörper**

30

BALB/cMäuse wurden zweimal innerhalb 17 Tage mit 5 µg gereinigten Antigen des Antikörpers 103/51 immunisiert, und 4 Tage nach der zweiten Immunisierung getötet. Die Milz wurde mechanisch entfernt und mit  $1 \times 10^7$  NSO Zellen, wie früher schon beschrieben (Vollmers et al., 1985 Cell 40:547-557), verschmolzen. Die Antikörper produzierenden Hybridome wurden durch immunohistochemi-

sche Färbung und der Reaktion in der Western blot Analyse getestet. Der Klon 58/47-69 mit positiver Reaktion wurde für die weiteren Experimente genutzt.

5

### **Immunohistochemisches Färben der Paraffin Sektionen**

In Paraffin eingebettete menschliche Magenschleimhaut mit Tumorzellen wurde zerkleinert (5µg), entparaffiniert, und blockiert mit BSA (15 mg/ml), welches in PBS verdünnt ist, für 30 Min. Die Sektionen wurden inkubiert mit dem Überstand der Hybridoma Zellen 103/51 oder 58/47-69, Ki 67 (Loxo, Dossenheim, Deutschland) oder Mausanti-cytokeration 8 Antikörper, verdünnt auf 1:15 mit BSA/PBS (Dako, Hamburg, Deutschland) für 2 Stunden in einem feuchten Inkubator. Anschließend wurden sie dreimal Tris/NaCl, gewaschen, gefolgt durch eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Hasen antihuman oder Hasen Antimaus-Konjugate (Dako), verdünnt auf 1:50 in PBS enthaltend ein Hasenserum (für den Antikörper 103/51) oder in PBS enthaltend menschliches AB Plasma (für Antikörper 58/47-69 und Anti-Cytokeratin). Nach dreimaligen Waschen mit Tris/NaCl und Inkubation in PBS für 10 Min. wurde das Färben mit Diaminobenzidine (0,05%)-Hydrogen Peroxyd (0.02%) für 10 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde unter laufendem Wasser gestoppt und die Sektionen wurden mit Hematoxylin gegengefärbt.

30

### **Immunohistochemisches Färben von lebenden und Aceton fixierten Zellen**

Für das Färben lebender Zellen wurden die Zellen herausgelöst, gewaschen und verdünnt auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml. 1 ml der Zelllösung werden bei 1.500 g für 5 Min. zentrifugiert. Der auf 40 µg/ml mit vollständigen RPMI verdünnte Antikörper wird zu einem Endvolumen von 1ml ergänzt und für 90 Min. auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen bei 1.500 g für 5 Min. pelletiert und wieder aufgelöst mit 500 µl RPMI. Mit 200 µl der Zelllösung werden die Zytospinpräparate präpariert und für 30 Min luftgetrocknet. Die Zellen werden in Aceton für 30 Min. fixiert und dreimal mit Tris/NaCl gewaschen. Die HRP-gekoppelten Hasen antihumanen IgM (DAKO) werden 1:50 in PBS/BSA (01,%) verdünnt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wird das Färben, wie oben erwähnt, durchgeführt.

Für das Färben der azeton-fixierten Zellen werden die Zytospins präpariert, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und, wie oben beschrieben, in Azeton fixiert. Dann werden die Zytospins für 15 Min. mit PBS/BSA (0,1%) blockiert und für 30 Min. mit 10 µg/ml primärer Antikörper inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern und das Färben wird, wie oben beschrieben, durchgeführt.

25

### **MTT-Proliferation Untersuchung**

30

Die MTT- Untersuchung der bekannten Zelllinie 23132 wurde wie beschrieben (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532) durchgeführt. Verkürzt wiedergeben wurden die trypsinisierten Zellen mit Wachstumsmedium auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt und eine 50 µl Zellsuspension wurde jeder Vertiefung eine 96-Loch Zellkulturplatte

zugegeben. Dann wurden 50 µl der Antikörper, verdünnt in den angegebenen Konzentrationen mit Wachstumsmedium, zu diesen Vertiefungen addiert und die Platten wurden für ein oder zwei Tage bei 37° C in einen feuchten Inkubator inkubiert. Zur Messung wurden 50 µl auf MTT (3(4,5 Dimethylthiazol)-2,5 Diphenyltetrazolium bromid) Lösung (5 mg/ml) in jede Vertiefung gegeben und die Platten wurden für 30 Min. inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten bei 800 g für 5 Min. zentrifugiert, die MTT Lösung entfernt und das gefärbte Zellpellet in 150 µl Dimethylsulphoxid auflöst und die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm und 690 nm gemessen.

#### **Methoden zur Bestimmung der Sequenz von CFR-1**

Die Präparation von RNA für die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits von Qiagen. Zur Vorbereitung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1.000 x g für 5 min pelletiert und entsprechend der Herstellerbeschreibung die RNA präpariert. 5 µg RNA (1-5 µl Lösung) wurden mit 1 µl Oligo-dT<sub>15</sub> (1 µg/µl) und 2 µl random primer (40 µM) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 8 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Es erfolgte die Denaturierung der RNA für 10 min bei 65°C und anschließend die Abkühlung der Probe auf Eis. Zu dieser wurden dann 17 µl Mastermix, bestehend aus 5,2 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 5 µl 5fach Reverse-Transkriptase-Puffer, 2,5 µl dNTPs (je 10 mM), 2,5 µl DTT (250 mM), 0,8 µl RNasin (400 U) und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U) pipettiert. Die Synthese der cDNA erfolgte für 70 min bei 37°C und wurde anschließend durch eine Erhitzung auf 95°C für 5 min abgebrochen. 1-5 µl der cDNA wurden mit dem PCR-Mastermix gemischt und auf 25 µl Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der PCR-Mastermix besteht aus 2,5 µl 10fach Taq-Polymerase-Puffer, 0,5 µl 10 mM NTPs, 1,5 – 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,5 µl 20 pM 3' bzw. 5' Primer und 0,2 µl Taq-

Polymerase (1U). Die Amplifikationsbedingungen für die verschiedenen PCR-Produkte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Übersicht der zur Amplifikation der verschiedenen cDNAs verwendeten PCR-Programme

10

15

Produkt	Annealing in [°C]	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Extensionszeit [sec]	Zyklen	Produktgröße [bp]
Fragment 1	55	1,75	45	40	691
Fragment 2	60	1,5	45	40	898
CFR Fragment 3	55	2,0	45	40	739
Fragment 4	55	2,0	45	40	941
Fragment 5	55	2,0	45	40	750

### Primer-Sequenzen

Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide

20

#### CFR

25

30

CFR-For 1	5'	OGC AGC TTC AGC AGC AAC AGC A	3'
CFR-Rev 1	5'	CAG CTC AGC CAC CCG GAG AAT G	3'
CFR-For 2	5'	GCT TGG AGA AAG GCC TGG TGA A	3'
CFR-Rev 2	5'	TGG CAC TTG CGG TAC AGG ACA G	3'
CFR-For 3	5'	GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG C	3'
CFR-Rev 3	5'	GCT TCC TGC AGA GTG TCA TTG C	3'
CFR-For 4	5'	GGA GGA CGT GTT GAA GCT TTG C	3'
CFR-Rev 4	5'	CCA GGG CAC AAG CAG TAT GAA G	3'
CFR-For 5	5'	CAA CAG CAG ACA GGT CAG GTG G	3'
CFR-Rev 5	5'	CCG GAA GTT CTG TTG GTA TGA G	3'

Die Sequenzierung erfolgte mit einem Sequenzierautomaten der Firma AppliedBiosystems. Für die Sequenzierung klonierter PCR-Produkte wurden die folgenden Oligos verwendet:

35

T<sub>3</sub> 5' ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'  
 T<sub>7</sub> 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'

5 3 µl Plasmid-DNA, isoliert wie unter 2.4.15. beschrieben, wurden mit 1 µl Primer (3,2 pM), 11 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl Reaktionsgemisch des Abi-Prism Sequencing Kits gemischt und im Thermocycler für 25 Zyklen mit den folgenden Parametern inkubiert:

	<u>Denaturierung</u>	<u>Annealing</u>	<u>Extension</u>
10	95°C, 30 sec	52°C, 15 sec	60°C, 4 min

15 Zum Entfernen von Oligos und dNTPs wurde das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G-50 Säule gereinigt. Hierzu wurde eine 100 µl Pipettenspitze bis zum oberen Rand mit Säulenmaterial beladen und für 3 min bei 2.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe aufgegeben und das Säulchen nochmals zentrifugiert. Die DNA wurde dann durch 2 µl Na-Azetat (pH 5,2) und 50 µl 100% Äthanol ausgefällt und durch eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 min pelletiert. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 3 µl Formamid/25 mM

20 EDTA (5:1) aufgenommen und im Sequenzierautomaten analysiert.

### Auswertung der Sequenzierungen

25 Von allen Klonierungen wurden mindestens fünf Klone sequenziert. Um Fehler zu beseitigen, die bei der Amplifikation mit der Taq-Polymerase bzw. der Sequenzierung entstanden sind, wurden die Sequenzen der klonierten PCR-Fragmente mit Hilfe der DNAsis für Windows Software untereinander verglichen und eine Konsensus-

30 Sequenz aller Klone aus beiden Leserichtungen erstellt. Durch Umschreiben der DNA-Sequenzen in Aminosäure-Sequenzen wurde dann die Anzahl der stillen Mutationen und der Aminosäure-

austauschmutationen bestimmt. Die Sequenzen für MG160 und CFR wurden aus der NCBI-Datenbank bezogen und mit dem DNAsis für Windows Programm mit Sequenzierungen der PCR-Produkte verglichen.

5

### Figuren und Tabellen

#### **Figur 1:** Identifizierung des Antigens des Antikörpers 103/51

10 a) Proteinreinigung des Antigens aus Membranextrakten der Magenkrebszelllinie 23132. Die Membranfraktionen werden chromatographisches Verfahren unterworfen und Ganzmembranfraktionen (Reihe 2) oder gereinigte Proteine (Reihe 3) werden mit Coomassie eingefärbt (Reihe 1 : 10 kDa Tabelle). Die Western Blot Analyse mit dem Antikörper 103/51 auf Membranfraktionen der Zelllinie 23132 angewendet zeigt eine Reaktion mit einem Protein mit Molekulargewicht von näherungsweise 130 kD (Reihe 4). Spezifitäten der gereinigten Membranextrakte wurde durch Westernblotting mit 103/51 kontrolliert (Reihe 5). Das durch einen Pfeil gekennzeichnete Protein wurde aus präparativem Gel gewonnen und für MALDI Massenspektrometrie und die Immunisierung von Mäusen genutzt.

15

20

b) Identifizierung der 130 kDa gelseparierten Proteine durch hochauflösende MALDI peptid Massenspektrometrie. Die mit „\*“ bezeichneten Spitzen geben die berechneten Massen der tryptischen Peptide des U28811 humanen systemischen fibroblast growth factor receptor (CFR-1) mit einer Massengenauigkeit von mehr als 50 ppm wider. Die mit „T“ bezeichneten Spitzen entsprechen den Autolyseprodukten des Trypsin. Der Einschub zeigt eine Massenauflösung ( $m/\Delta m = 9000$ ) der Spitzen bei  $m/z$  1707.818.

25

30



**Figur 2:** Einfluß der CFR-1 Antisense-Transfektion auf Färbungen von Antikörpern 103/51 und Lebendzellfärbung (Vergrößerung 200x).

- 5 a) Die Zelllinie 23132 wurde mit Kontrollvektor vorübergehend transfiziert und die Azetonfixierung zeigt eine intensive Färbung mit Antikörper 103/51.
- b) Eine reduzierte Einfärbung von kurz mit CFR-1 Antisensevektor transfizierten Zellen ist sichtbar.
- 10 c) Um den Hintergrund im immunohistochemischen Färbungen zu verringern, wurden Lebendzelle der Zelllinie 23132 eingefärbt. Eine deutliche Membranfärbung ist sichtbar.
- d) Zur Kontrolle eine Lebendzellfärbung (nur sekundäre Antikörper) der Zelllinie 23132.
- 15 e) Das negative Lebendzellfärbung der Zelllinie Colo-699 mit dem Antikörper 103/51 zeigt, daß diese Zelllinie für CFR-1 negativ ist.
- f) Zur Kontrolle Lebendzellfärbung (nur sekundäre Antikörper) mit der Zelllinie Colo-699.
- g) Durchflußzytometrie mit der Zelllinie 23132 mit Antikörpern Chromopur human IgM (grau) und 103/51.
- 20 h) Analyse von Zellen, die mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 transfiziert sind, mit Durchflußzytometrie 48 Stunden nach der Transfektion.
- i) Zellen, die mit dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert sind, zeigen einen deutlichen Abfall in der Bindung des Antikörpers 103/51.
- 25

**Figur 3:** Einfluß der Deglycosylation auf die Färbung mit Antikörper 103/51

- 30 a) Zellen (23132) mit Deglycosylationspuffer inkubiert und Azeton fixiert zeigen eine intensive Färbung mit Antikörper 103/51.

b) Zellen (23132), die mit N-Glycosidase behandelt und anschließend Azeton fixiert wurden, zeigen eine deutliche Verringerung der Färbung.

5 c) Der Einfluß des Declycosylation auf Membranextrakte der Zelllinie 23132 in Reaktion mit dem Antikörper 103/51 in Westernblot-Analyse. Die für 16 Stunden mit Declycosylationspuffer (Puffer) inkubierten Extrakte zeigen keinen Unterschied im Färben im Vergleich zu unbehandelten Extrakten (Kontrolle). Die Inkubation mit N-Glycosydase führt zu einer deutlichen Verminderung im Färbung (N-Glyco).

10

**Figur 4:** Immunohistochemische Färbung mit murinen Antikörpern 58/47-69 und 103/51 auf Magenadenokarzinomen

15 Um identische Spezifität des Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 zu zeigen, wurde Magenadenokarzinomzellen vom diffusen Typ eingefärbt mit Hämatoxilin-Eosin (a), Antikörpern 103/51 (b) und 58/47-69 (c), und Antizytokeratin 18 als positive Kontrolle. Die identische Färbung in c und d zeigt identische Spezifität (Pfeile = Tumorzellen).

20

**Figur 5:** Immunhistochemische Färbung des Antikörper 103/51 auf verschiedenen Magengeweben

25 Cryosektionen von Magengeweben werden mit HE, Antikörper Ki67 (um die proliferierenden Zellen anzuzeigen) und Antikörper 103/51 gefärbt (Vergrößerung x100)

a) Magengewebe mit Entzündungen

30 b) H. pylori induzierte Gastritis (die Einschübe zeigen eine Vergrößerung der markierten Drüsen)

c) Dysplasi

d) Magenadenokarzinom

**Figur 6:** Immunhistochemisches Färbung mit Antikörper 103/51 auf verschiedenen kanzerogenen und normalen Geweben

5 Das Färben der Antikörper 103/51 wird bei folgenden Geweben gezeigt: Karzinom des Vater-Gefäßes (a), lobulär invasives Brustkarzinom (b), Adenokarzinom des Darmes und keine Färbung der normalen Becherzelle der Darmschleimhaut (c), Leberzellenkarzinom (d), glomerulare und fasciculare Bereiche der Nebennierenrinde (e),  
10 Sammelgefäße der nierenspezifischen Färbung des Golgi-Apparates (Pfeil) (f). Die Pfeile in a - d zeigen Tumorzellen, der rote Pfeil in (c) = Becherzellen, der Pfeil in (f) deuten den Golgi-Apparat an (Vergrößerung 400x, mit Ausnahme (g) 200x).

15

**Figur 7:** Stimulation der Zelllinien mit Antikörpern 103/51 und 58/47-69 durch kolorimetrische MTT-Untersuchung bestimmt

a) Die Titration mit gereinigtem Antikörper 103/51 zeigt ein Anwachsen der Stimulation bis zu 4 µg/ml. Höhere Konzentrationen führen  
20 nicht zu einer höheren Stimulation (c = Control, keine Zugabe von Antikörper).

b) Eine MTT-Untersuchung mit gleichen Konzentration (4 µg/ml) von gereinigten Antikörpern 103/51 und 58/47-69 zeigen vergleichbare Stimulationen der Tumorzelllinien 23132 nach ein oder zwei Tagen  
25 Inkubation (Kontrolle 1 = Chrompur humanes IgM, Kontrolle 2 = unkorreliertes Maus IgM).

c) Die Zelllinie 23132 wurde vorübergehend mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 oder CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert, für 24 Stunden inkubiert und in einer MTT-Untersuchung nach Stimulation mit 4  
30 µg/ml gereinigtem Antikörper 103/51 nach 24 Stunden getestet. Die nicht transfizierten Zellen wurden ebenso zur Kontrolle inkubiert (Kontrolle = nichtkorrelierter humaner IgM).

5 d) Eine MTT-Untersuchung mit gleichen Konzentrationen (4 µg/ml) des Antikörpers 103/51 auf unterschiedlichen Epithelialtumorzelllinien zeigen eine Stimulation nur der CFR-1 positiven Zelllinien 23132 24 Stunden nach Beigabe des Antikörpers. Die CFR-1 negativen Zelllinien Colo-699 und EPLC-272H zeigen keine Stimulation durch den Antikörper 103/51.

10 **Tabelle 1:** Reaktionsmuster des Antikörpers 103/51 mit verschiedenen Geweben

Die Färbung mit Antikörpern wurde wie folgt bewertet:

- = kein Färben, + = mäßiges Färben, ++ = intensives Färben. HCC = Hepatozellkarzinom (Leberzellkrebs), <sup>1</sup> Proliferationsbereich, Drüsenvertiefung, <sup>2</sup> Glomerular, Fascicularbereich (Membranfärben),  
15 <sup>3</sup> Sammelgefäße des retikulären Endothelgewebes.

Anlage A

Anlage B

20 Anlage S: Vergleich der Aminosäuresequenz der aus der Zelllinie 23132 gewonnenen CFR-1 mit den bereits veröffentlichten Sequenzen von CFR-1 und MG160.

Diese Vergleichsversuche beweisen zunächst, daß das aus der Zelllinie 23132 gewonnene CFR-1-Protein nicht identisch ist mit den vorbekannten CFR-1-Sequenzen sondern demgegenüber eine Isoform darstellt. Neben den Unterschieden gegenüber den vorbekannten  
25 und veröffentlichten CFR-1 und MG160 ist die Aminosäuresequenz einer speziellen Ausführungsform des allgemein beanspruchten Rezeptors abgesehen und von dem ersten und speziell gekennzeichneten Positionen eindeutig festgelegt.

30

## RESULTATE

### Reinigung und Identifizierung des Antigens 103/51

Die Western Blot Analyse wurde benutzt, um zu zeigen, daß der Antikörper 103/51 an ein etwa 130 kD Membranprotein auf einer Magenkrebszelle bindet. Die Vorreinigung dieses Proteins erfolgte durch sequenzielle Größenausschluß- und Anionenaustauschchromatographie (Fig. 1a). Das Protein wurde gewonnen aus einer Coomassie-gefärbten präparativen SDS-PAGE, ein Anteil hiervon wurde benutzt, um monoklonale Mausantikörper herzustellen (siehe unten) und der andere Teil wurde benutzt, um das Protein nach dem Verfahren, wie es Shevchenko et al. (1996 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:14440:14445) beschrieben hat, zu identifizieren. Nach 3 Stunden in Geldigestieren mit Trypsin, wurden ca. 1% des insgesamt digestierten Volumens entfernt und einer hochgenauen MALDI peptid Massenspektrometrie (der Rest wurde für eine Nanoelektrospraya-

analyse aufbewahrt, da eine MALDI MS nicht zu einer definierten Identifikation führte). Trotz des im Femtomolbereich liegenden Verbrauches des Proteindigestes für die MALDI-Analyse ergab die Untersuchung 35 Peptide der CFR-1 Sequenz mit einer Massengenauigkeit innerhalb von 50 ppm. Diese Peptide bilden 29% der CFR-1 Sequenz und identifizieren das Protein auf diese Weise das Protein, das ein errechnetes Molekulargewicht von etwa 134 kD hat (Burrus et al., 1992 Mol.Cell Biol. 12:5600-5609) (Fig. 1b).

### Der Effekt der vorübergehenden Transfektion der Zelllinie 23132 mit dem CFR-Antisense-Vector auf die Färbung des Antikörpers 103/51 und Färbung von Lebendzellen

Wir untersuchten den Effekt der Antisensetransfektion der Magenkrebszelllinie 23132 unter Benutzung der Immunohistochemie und Durchflußzytometrie. Zu diesem Zweck wurde ein 897 bp PCR-

Fragment des CFR, aus dem Bereich der Basenpar 802 und 1699 entnommen, mit dem pHOOK-2-Vector im Antisensesinne im Bezug zum CMV promotor geklont. Die gewaschenen Zellen wurden in einen Zwischenschritt mit dem pHOOK-CFR Antisensevector pHOOK-lacZ und pHOOK Vektor transfiziert. Die Transfektion wurde durch eine  $\beta$ -Galatosidase Untersuchung (Daten nicht gezeigt) überprüft. 48 Stunden nach der Transfektion wurden Cytospins präpariert und mit Antikörpern 103/51 und Anti-Zytokeratin 18 zur Kontrolle gefärbt (Daten nicht gezeigt).

Die Immunohistochemie zeigt eine deutliche Reduzierung der Zellfärbung, die mit pHOOK-CFR Antisense Vektor transfiziert sind, im Vergleich mit Kontrollzellen (Fig. 2 a – b). Das bestätigt die Bindung des Antikörpers 103/51 an CFR-1. Das leichte zytoplasmatische Färben, das in beiden Färbeprozessen zu sehen war, kann seine Ursache in nichtspezifischen Bindungen haben, wie sie oft beim Färben von menschlichen IgM Antikörpern auf azetonfixierten Zellen beobachtet wird. Die Zellexpression als auch der Einfluß der Transfektion wurden durch Durchflußzytometrie überprüft (Fig. 2 g – i). Die Daten zeigen eine Reduzierung von Bindungen des Antikörpers 103/51 nach Transfektion von Zellen mit dem CFR-1 Antisense Vektor. Jedoch zeigen unbehandelte Zellen oder Zellen, die mit den Kontrollvektor pHOOK-2 transfiziert wurden, eine deutliche Bindung zur Zelllinie 23132, was die Expression von CFR-1 auf der Zellmembran zeigt.

Um die spezifische Membranverteilung der CFR-1 Isoform zu untersuchen, färbten wir lebende Zellen der Zelllinie 23132 und einiger Nichtmagenkrebszelllinien. Auf der Zelllinie 23132 ergab sich ein deutliches Färben (Fig. 2 c, d), während menschliche Lungenkarzinomzelllinien Colo-699 (Fig. 2 e, f) und EPLC-272H (Daten nicht gezeigt) eindeutig negativ waren. Diese Daten zeigen, daß die be-

schrieben CFR-1 Isoform nicht in allen Krebszelllinien vorhanden ist und ausschließlich das Einfärben der Membrane von 23132 Zellen zeigt, daß die CFR-1 Isoform eine Verteilung hat, die von der bislang für CFR-1 beschriebenen verschieden ist.

5

### **Glycosidaseassay**

CFR-1 ist ein Sialoglycoprotein mit 5 möglichen N-Glycosylation-Armen und es wurde durch Behandlung mit Glycosidase F gezeigt, daß das Molekül an diesen Stellen glycosoliert (Steegmaier et al. Nature 373:615-620, 1995). Da tumorreaktive Antikörper oft mit Carbohydrat-Gruppen reagieren, haben wir untersucht, ob dies auch für den Antikörper 103/51 der Fall ist. Cytospinpräparationen der Zelllinie 23132 wurden für 4 Stunden mit O- und N-Glycosidase inkubiert und anschließend einem immunhistochemischen Färben mit dem Antikörper 103/51 unterworfen. Die Behandlung der Zelle mit N-Glycosidase führte zu einer dramatischen Verringerung in der 103/51 Färbung (Fig. 3 b), während die Inkubierung mit Dephosphorylation Puffer (Fig. 3 a) oder die Bearbeitung mit O-Glycosidase (Daten nicht gezeigt) keine Auswirkung auf die Bindung des Antikörpers 103/51 haben. Dies zeigt, daß die Bindungsspezifizität des Antikörpers 103/51 in den Zuckerbestandteilen und nicht in den primären Proteinsequenzen lokalisiert sind. Zur weiteren Überprüfung dieses Effektes wurden die Membranextrakte der Zelllinie 23132 für 16 Stunden deglycosyliert und Western Blots durchgeführt und mit Antikörpern 103/51 gefärbt. Wir fanden eine Verringerung der Reaktion mit Lysaten, die mit N-Glycosidase inkubiert waren, im Vergleich zu den Kontrolllysaten (Fig. 3 c).

30

### **Herstellung muriner Antikörper und immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten des Magenkarzinoms**

Da Antikörper gegen CFR-1 nicht käuflich erwerbbar sind, wurden Mäuse mit gereinigtem Protein, welches aus Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgewaschen wurde, für die Produktion monoklonaler Antikörper immunisiert um die Spezifität zu bestätigen und weiterhin die CFR-1 Expression zu charakterisieren. Milzzellen wurden durch Fusion mit Heteromyelomzellen NSO konserviert. 150 Klone wurden durch immunhistochemisches Färbungen getestet. Die positiven Klone wurden erneut geklont und das Klon 58/47-49 (IgM) wurde zur weiteren Charakterisierung genutzt. Um die Bindungseigenschaften des humanen Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 zu untersuchen, färbten wir die Paraffinschnitte von 15 verschiedenen Magenadenokarzinom- und einem Adenozellen. Identisches Färben der Drüsenzellen der normalen Epithelialgewebe und intensives Färben der Karzinomzellen wurde erhalten (Fig. 4). Verkürzt wiedergegeben wurden die ersten Karzinomgewebe (n = 2) mit beiden Antikörpern gefärbt. Bei Darmkarzinomzellen haben beide Antikörper 4 von 5 Fällen angefärbt, bei diffusen Karzinomgeweben wurden alle Fälle (n = 4) gefärbt und bei Zwischentypen waren 50% (n = 4) bei beiden Antikörpern positiv. Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Expressionsrate von CFR-1 in den meisten Fällen des Magenkarzinomgewebes. Das untersuchte Adenomagebe zeigte ein bestimmtes Färbemuster mit positiven Zellen, nur im Übergang von den normalen zu den transformierten Zellen.

25

#### **Immunohistochemisches Färben mit Antikörper 103/51 auf Magenschleimhaut**

Um die Reaktionen des Antikörpers 103/51 auf Magenschleimhaut näher zu untersuchen, haben wir ein immunohistochemische Färbungen von Magengewebe ohne Entzündung, durch H. pylori bedingte chronisch aktive Gastritis, hochgradige Dysplasie und Magenadenokarzinom durchgeführt. Bei dem nichtentzündeten Magenge-

30



webe wurden keine Reaktionen beobachtet (Fig. 5). Jedoch fanden wir in der Magenschleimhaut eines Patienten mit H. pylori Gastritis eine Einfärbung primär im Basalbereich der Foveolarzellen. Das Färbemuster des Antikörpers 103/51 zeigt einen strengen Zusammenhang mit dem Aktivierungsmuster, wie es sich beim Ki67-Färben zeigt (Ramires et al., 1997 J. Pathol 182:62-67). Eine intensivere Färbung des Antikörpers 103/51 konnte im Proliferationsbereich der Magendysplasi gesehen werden, das ebenso Übereinstimmung mit dem Ki67-Färbung zeigt. Die stärkste Färbung wurde in den Proliferationsbereich der Magenadenokarzinoma gefunden.

#### **Immunohistochemisches Färben der Antikörper 103/51 und 58/47-69 auf verschiedenen Geweben**

Wir untersuchten die Expression von CFR-1 in anderen kanzerogenen und normalen Geweben durch immunhistochemische Färbung auf Paraffinschnitten mit den Antikörpern 103/51 und 58/47-69. Bei 15 Krebsgeweben (verschiedener Magenkrebsarten) zeigte der Antikörper 103/51 ein Färben in 13 Fällen (Fig. 6, Tab. 1a). Ein negatives Ergebnis wurde bei den anaplastischen Zellen der Lunge beobachtet, was die Ergebnisse des immunhistochemische Färbung und der MTT-Untersuchung mit den Zelllinien Colo-699 und EPLC-272H bestätigt. Diese Daten zeigen eine starke Expression auf CFR-1 und eine Verteilung in den Zellmembranen der durch Geschwulste veränderten Zellen.

Bei den 28 untersuchten normalen Geweben wurde eine geringe Expression nur in 3 Darmproben gefunden (Tab. 1 b). Eine Färbung der Membrane wurde bei Foveoladrüsen des Magens und den glomerularen und fascicularen Bereiche der Drüsenzellen beobachtet, wohingegen ein Färben des Golgi-Apparates in den Sammelröhren der Niere gefunden wurde (Fig. 5). Dies bestätigt weiterhin die Charakte-

risierung des Antigens als CFR-1, wie es schon früher durch Burrus et al. (1992) Mol.Cell Biol. 12:5600-5609 beschrieben wurde.

5        **Stimulierung mit humanen und murinen monoklonalen Antikörpern**

Wie bereits in früheren Publikationen (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532; Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) erläutert, führt der Antikörper 103/51 zu einer Stimulation der Zelllinie 23132 in vitro. Wir haben diese Stimulation des Antikörpers 103/51 durch Anwendung der Mitochondrialhydroxylaseuntersuchung (MTT) gemessen, welches eine Standarduntersuchung für Proliferation darstellt (Carmichael et al., 1987 Cancer Res. 47:936-942). Um weiterhin die Stimulationseigenschaften des Antikörpers 103/51 zu untersuchen, haben wir die Zelllinie 23132 mit verschiedenen Konzentrationen gereinigter Antikörper inkubiert. Wir fanden eine konzentrationsabhängige Stimulierung mit höchster Aktivität bei 4 µg/ml (Fig. 7 a). Höhere Konzentrationen zeigten ein leichtes Abfallen in der Stimulation.

20        Um zu untersuchen, ob der murine Antikörper 58/47-69 den gleichen Einfluß auf das Zellwachstum hat, haben wir die MTT-Stimulationsuntersuchung mit gereinigten Antikörpern in vergleichbarer Menge durchgeführt. Wie aus Fig. 7 b entnommen werden kann, führten beide Antikörper zu einer Stimulation der Zelllinie 23132 in vitro. Dies bestätigt weiterhin die identische Spezifität beider Antikörper.

30        Um zu bestätigen, daß die Stimulation des Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 durch die Bindung an CFR-1 vermittelt wird, haben wir die Zellen mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 und dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert und die Zellen durch eine MTT-Untersuchung getestet. Als positive Kontrolle für die

Transfektion wurden die Zellen ebenso mit den pHOOK-2-lacZ Vektor transfiziert und danach mit  $\beta$ -Galactosidose eingefärbt (Daten nicht gezeigt). Da vergleichbare Stimulationen in den nichttransfektierten Fällen und den Zellen, die mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 transfiziert wurden, beobachtet werden konnte, kann eine Reduzierung des Stimulationseffektes durch den Transfektionsprozeß ausgeschlossen werden. Im Gegensatz hierzu zeigten die Zellen, die mit dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert wurden, eine verringernde Stimulation (Fig. 7 c).

Schließlich wurde, um zu zeigen, daß die Stimulation durch den Antikörper 103/51 nicht durch andere Rezeptoren als den CFR-1 vermittelt wurde, eine MTT-Stimulationsuntersuchung mit der Zelllinie 23132 vorgenommen und mit der CFR-1 negativen Lungenkarzinomzelllinien Colo-699 und EPLC-272H verglichen. Während die Zelllinie 23132, wie oben beschrieben, stimuliert wird, zeigten die beiden Lungenkarzinomzelllinien keine Stimulation durch den Antikörper 103/51 (Fig. 7 d), was die Resultate der Immunhistochemie bestätigt.

## Patentansprüche

- 5           1. Rezeptor auf der Oberflächenmembran von stark proliferierenden  
Zellen insbesondere des Magenkarzinoms, der aus Glykoproteinen  
aufgebaut ist,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass wenigstens eine Determinante des Glykoproteins mit einer des  
CFR-1 Proteins übereinstimmt und  
10           der humane Antikörper 103/51 und/oder der murine Antikörper  
58/47-69 (IgM) am Glykoprotein spezifisch bindet.
- 15           2. Rezeptor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die  
spezifische Bindungsstelle am Glykoprotein ein Carbohydrat-Rest (=  
Zucker-Rest) ist.
- 20           3. Rezeptor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** dass die  
primäre Aminosäuresequenz des Glykoproteins zu mindestens 80 %  
mit der des CFR-1 übereinstimmt (homolog ist).
- 25           4. Rezeptor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die  
Determinante des Glykoproteins die in Anlage S Zelllinie 23132 wie-  
dergegebene Aminosäuresequenz aufweist.
- 30           5. Rezeptor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **gekennzeichnet**  
**durch** ein Molekulargewicht von etwa 130 kD.

6. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Rezeptor zur Ausbildung von Antikörpern in vivo verabreicht wird.

5

7. Verwendung des Rezeptors zur Bekämpfung von Tumoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Rezeptor vor (zur Prophylaxe) oder mit dem Ausbruch der Krankheit (zur Therapie) verabreicht wird.

10

8. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bekämpfung folgender Tumore: Speiseröhre, Magen, Darm, Rektum, Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Bronchien, Brust, Cervix, Prostata, Cardia, Barrett, Eierstock und/oder Uterus.

15

9. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bekämpfung folgender Tumorstufen:

20

des Magens:

- Dysplasie der Magenschleimhaut
- Intestinale Metaplasie des Magens
- Helicobacter pylori assoziierte Gastritis
- Tubuläre und tubulovillöse Adenome des Magens

25

des Dickdarmes:

- Tubuläre Adenome des Colons
- Villöse Adenome des Colons
- Dysplasie bei Collitis ulcerosa

30

in der Speiseröhre

- Barrett-Dysplasie des Ösophagus
- Barrett-Metaplasie des Ösophagus

5 des Gebärmutterhalses

- Cervicale intraepitheliale Neoplasie I
- Cervicale intraepitheliale Neoplasie II
- Cervicale intraepitheliale Neoplasie III

10 der Lunge:

- Plattenepithel Metaplasie des Bronchus
- Plattenepithel Dysplasie des Bronchus

15 10. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche zu Diagnosezwecken, **dadurch gekennzeichnet**, dass über die Bindefähigkeit von Antikörpern an den Rezeptor ein Nachweis für die Existenz, die Lokalisierung und/oder die Menge der entsprechenden Antikörper bzw. Rezeptoren geführt wird.

20

11. Verwendung nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Antikörper Tumorantikörper sind.

25

12. Verwendung nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Rezeptor ein Tumormarker ist.

30

13. Verfahren zur Gewinnung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** folgende Schritte:

- 5 a) Präparieren von Membranproteinen von Zellen der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132  
b) Durchführen einer Größenausschlußchromatographie sowie  
c) einer Anionenaustauschchromatographie und  
d) schließlich Gewinnung durch eine präparative SDS-PAGE.

10 14. Muriner Mausantikörper 58/47-69 zur Verwendung in einem der vorhergehenden Ansprüche und einer Struktur, die durch folgende Merkmale gekennzeichnet ist:

Die variable Region der schweren Kette ist homolog zur IGHV 1S 125\* 01 gemäß Anlage A, wobei das D-Segment homolog zu IGHD-ST 4\*01 und das J-Segment homolog zur IGHJ4\*01 ist, und die variable Region der leichten Kette eine Struktur gemäß Anlage B aufweist, die homolog zu IGKV- 17\* 01 ist, wobei das J-Segment homolog ist zu IGKJ2\*01.

20 15. Verfahren zur Herstellung eines Antitumormittels unter Verwendung von Rezeptoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**,  
dass eine potentiell antitumorwirksame Substanz auf ihre spezifische Bindefähigkeit an Rezeptoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche überprüft und bei positiven Ergebnis diese Substanz für die pharmazeutische Anwendung konfektioniert und hierbei mit üblichen  
25 Zusatzstoffen versehen wird.

30 16. Verfahren zur Herstellung eines Antitumormittels unter Verwendung von Rezeptoren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Substanzen um humane Antikörper und/oder Mausantikörper und/oder humanisierte Mausantikörper und/oder Fab

und F(ab)<sub>2</sub>- und Fab'-Fragmente und/oder Einzelstrangantikörper und/oder tetramere und/oder dimere Antikörperformen und/oder bispezifische Antikörper handelt.



Fig. 1

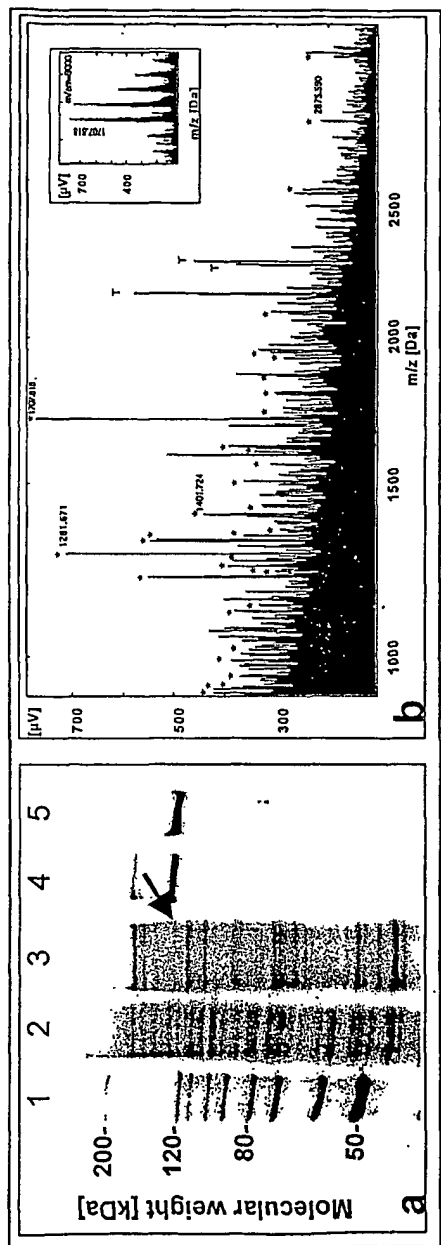


Fig. 2

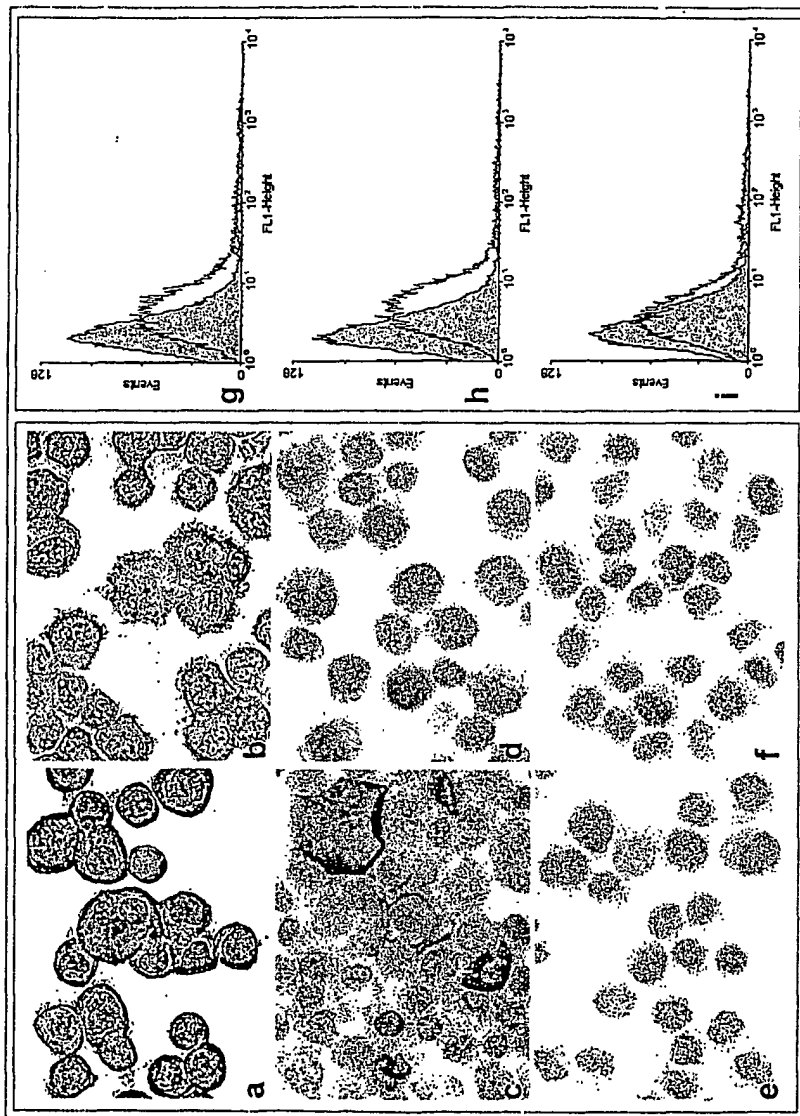


Fig. 3

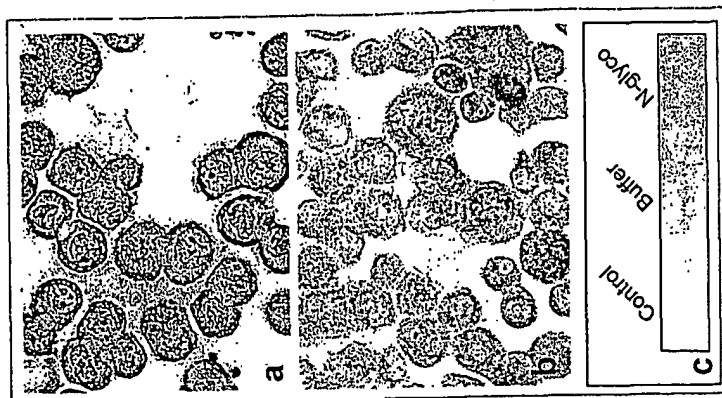


Fig. 4

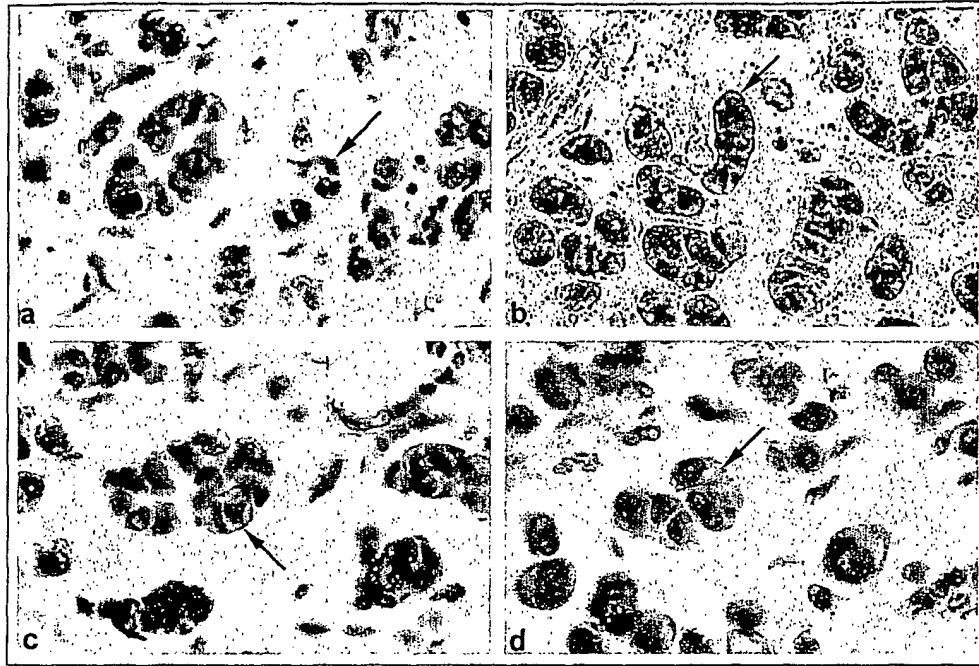


Fig. 5

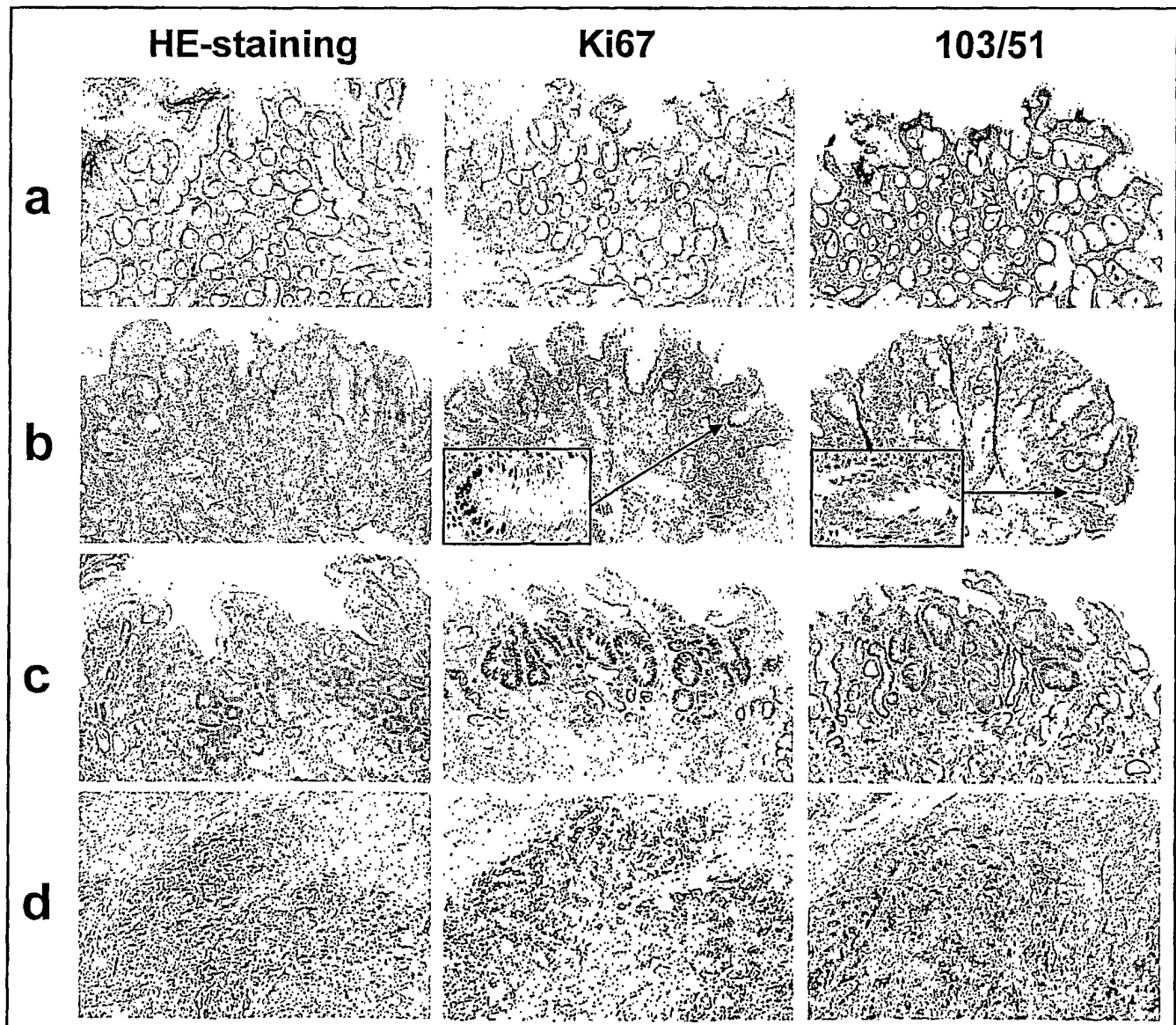


Fig. 6

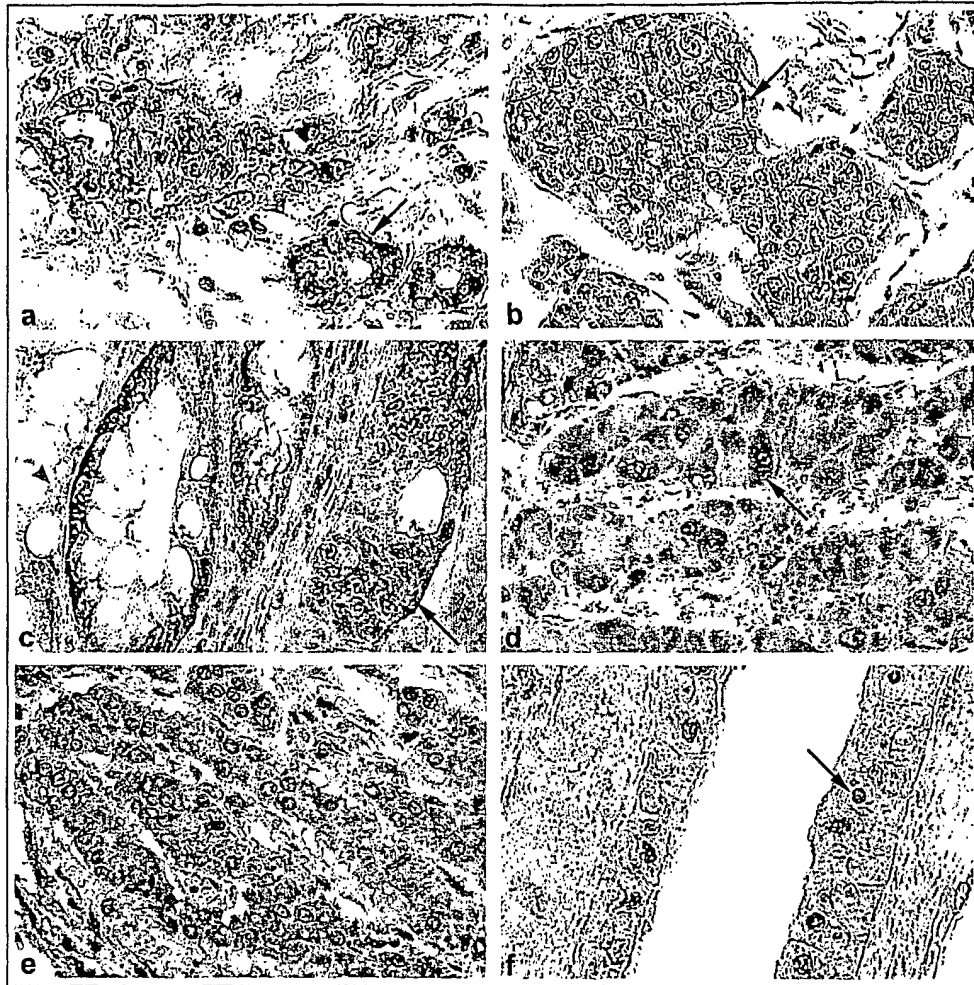
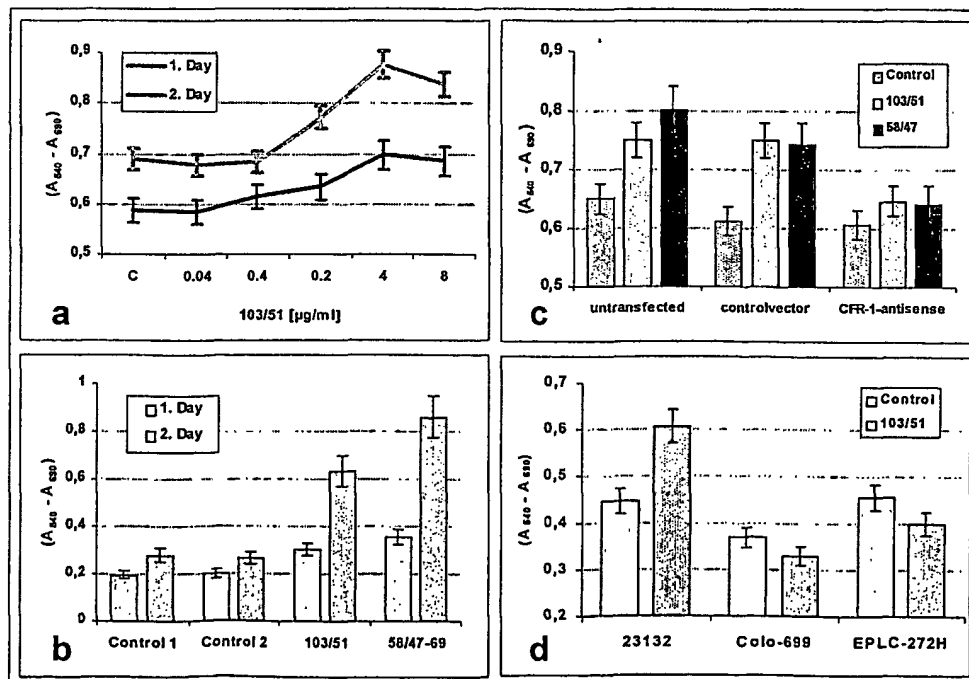


Fig. 7



**Tab. 1****a) Tumor tissues**

Tissue	Carcinoma-type	Antibody-Staining
Esophagus	Squamous	+
Stomach	Adeno (diffuse)	++
Stomach	Adeno (intestinal)	+
Colon	Adeno	+
Rectum	Adeno	+
Liver	Adeno (HCC)	++
Gallbladder	Adeno	+
Pancreas	Adeno (ductal)	+
Papilla of Vater	Adeno	+
Lung	Large cell anaplastic	-
Lung	Small cell	-
Lung	Adeno	++
Bronchus	Squamous epithelium	+
Mamma	Invasive (ductal)	+
Mamma	Invasive (lobular)	+

**b) Normal tissues**

Tissue	Cell type	Antibody-Staining
Salivary gland	Glandular	-
Stomach (non inflammated)	Glandular	-
Stomach ( <i>H. pylori</i> infected)	Glandular	+ <sup>1</sup>
Stomach (high grade dysplasia)	Glandular	++ <sup>1</sup>
Duodenum	Glandular	-
Colon	Epithelial	-
Rectum	Glandular	-
Pancreas	Glandular	-
Liver	Glandular	-
Gallbladder	Glandular	-
Oral mucosa	Squamous epithelium	-
Anal mucosa	Squamous epithelium	-
Skin	Keratinocyte, glandular	-
Mamma	Glandular	-
Larynx	Epithelial	-
Bronchus	Epithelial	-
Lung	Glandular, alveolar	-
Thyroid gland	Glandular	-
Adenohypophysis	Glandular	-
Adrenal gland	Glandular	++ <sup>2</sup>
Testis	Glandular	-
Ovar	Glandular	-
Prostate	Glandular	-
Urothelium	Epithelial	-
Kidney	Epithelial	++ <sup>3</sup>
Thymus	Lymphatic	-
Spleen	Lymphatic	-
Lymph node	Lymphatic	-
Cerebral cortex	Neural	-
Peripheric neural ganglia	Neural	-

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad  
 Prof. Dr. Vollmers, Heinz  
 Dr. Hensel, Frank

<120> Rezeptor, dessen Verwendung und Mausantikörper

<141> 2002-03-09

<211> 288 bp

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<220> Sequenz der variablen Region der schweren Kette (V<sub>H</sub>) des Antikörpers NM58-49/69

<221> V-Region

<222> (1).....(288)

<400>

tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act gac tac tat ata aac tgg gtg aag cag agg	60
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg	
1 5 10 15 20	
act gga cag ggc ctt gag tgg att gga gag att tat cct gga agt ggt aat act tac tac	120
Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr	
25 30 35 40	
aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	180
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
45 50 55 60	
atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt gca aga tcg gga	240
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly	
50 55 60 65	
tta cga ccc tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc	288
Leu Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr	
70 75 80	

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad  
 Prof. Dr. Vollmers, Heinz  
 Dr. Hensel, Frank

<120> Rezeptor, dessen Verwendung und Mausantikörper

<141> 2002-03-09

<211> 315 bp

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<220> Sequenz der variablen Region der leichten Kette (V<sub>L</sub>) des Antikörpers NM58-49/69

<221> V-Region

<222> (1).....(315)

<400>

cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag	60
Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln	
1 5 10 15 20	
agc att gta cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag	120
Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln	
25 30 35 40	
tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc	180
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
45 50 55 60	
agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat	240
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp	
65 70 75 80	
ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc	300
Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr	
85 90 95 100	
aag ctg gaa ata aaa	315
Lys Leu Glu Ile Lys	
105	

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad  
 Prof. Dr. Vollmers, Heinz  
 Dr. Hensel, Frank

<120> Rezeptor, dessen Verwendung und Mausantikörper

<141> 2002-03-09

<211> 3114

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> Cysteine-rich FGF Rezeptor der Magenkarzinomzelllinie 23132

<221> CDS

<222> (450).....(3563)

<400>

450	GAT GTG AGG GAG CCT GAA AAT GAA ATT TCT TCA GAC TGC AAT CAT TTG TTG TGG AAT TAT	509
	Asp Val Arg Glu Pro Glu Asn Glu Ile Ser Ser Asp Cys Asn His Leu Leu Trp Asn Tyr	
	143 145 150 155 160	
	AAG CTG AAC CTA ACT ACA GAT CCC AAA TTT GAA TCT GTG GCC AGA GAG GTT TGC AAA TCT	569
	Lys Leu Asn Leu Thr Thr Asp Pro Lys Phe Glu Ser Val Ala Arg Glu Val Cys Lys Ser	
	165 170 175 180	
	ACT ATA ACA GAG ATT GAA GAA TGT GCT GAT GAA CCG GTT GGA AAA GGT TAC ATG GTT TCC	629
	Thr Ile Thr Glu Ile Glu Glu Cys Ala Asp Glu Pro Val Gly Lys Gly Tyr Met Val Ser	
	185 190 195 200	
	TGC TTG GTG GAT CAC CGA GGC AAC ATC ACT GAG TAT CAG TGT CAC CAG TAC ATT ACC AAG	689
	Cys Leu Val Asp His Arg Gly Asn Ile Thr Glu Tyr Gln Cys His Gln Tyr Ile Thr Lys	
	205 210 215 220	
	ATG ACG GCC ATC ATT TTT AGT GAT TAC CGT TTA ATC TGT GGC TTC ATG GAT GAC TGC AAA	749
	Met Thr Ala Ile Ile Phe Ser Asp Tyr Arg Leu Ile Cys Gly Phe Met Asp Asp Cys Lys	
	225 230 235 240	
	AAT GAC ATC AAC ATT CTG AAA TGT GGC AGT ATT CGG CTT GGA GAA AAG GAT GCA CAT TCA	809
	Asn Asp Ile Asn Ile Leu Lys Cys Gly Ser Ile Arg Leu Gly Glu Lys Asp Ala His Ser	
	245 250 255 260	
	CAA GGT GAG GTG GTA TCA TGC TTG GAG AAA GGC CTG GTG AAA GAA GCA GAA GAA AGA GAA	869
	Gln Gly Glu Val Val Ser Cys Leu Glu Lys Gly Leu Val Lys Glu Ala Glu Glu Arg Glu	
	265 270 275 280	
	CCC AAG ATT CAA GTT TCT GAA CTC TGC AAG AAA GCC ATT CTC CGG GTG GCT GAG CTG TCA	929
	Pro Lys Ile Gln Val Ser Glu Leu Cys Lys Lys Ala Ile Leu Arg Val Ala Glu Leu Ser	
	285 290 295 300	
	TCG GAT GAC TTT CAC TTA GAC CGG CAT TTA TAT TTT GCT TGC CGA GAT GAT CGG GAG CGT	989
	Ser Asp Asp Phe His Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ala Cys Arg Asp Asp Arg Glu Arg	
	305 310 315 320	
	TTT TGT GAA AAT ACA CAA GCT GGT GAG GGC AGA GTG TAT AAG TGC CTC TTT AAC CAT AAA	1049
	Phe Cys Glu Asn Thr Gln Ala Gly Glu Gly Arg Val Tyr Lys Cys Leu Phe Asn His Lys	
	325 330 335 340	

TTT GAA GAA TCC ATG AGT GAA AAG TGT CGA GAA GCA CTT ACA ACC CGC CAA AAG CTG ATT	1109
Phe Glu Glu Ser Met Ser Glu Lys Cys Arg Glu Ala Leu Thr Thr Arg Gln Lys Leu Ile	
345 350 355 360	
GCC CAG GAT TAT AAA GTC AGT TAT TCA TTG GCC AAA TCC TGT AAA AGT GAC TTG AAG AAA	1169
Ala Gln Asp Tyr Lys Val Ser Tyr Ser Leu Ala Lys Ser Cys Lys Ser Asp Leu Lys Lys	
365 370 375 380	
TAC CGG TGC AAT GTG GAA AAC CTT CCG CGA TCG CGT GAA GCC AGG CTC TCC TAC TTG TTA	1229
Tyr Arg Cys Asn Val Glu Asn Leu Pro Arg Ser Arg Glu Ala Arg Leu Ser Tyr Leu Leu	
385 390 395 400	
ATG TGC CTG GAG TCA GCT GTA CAC AGA GGG CGA CAA GTC AGC AGT GAG TGC CAG GGG GAG	1289
Met Cys Leu Glu Ser Ala Val His Arg Gly Arg Gln Val Ser Ser Glu Cys Gln Gly Glu	
405 410 415 420	
ATG CTG GAT TAC CGA CGC ATG TTG ATG GAA GAC TTT TCT CTG AGC CCT GAG ATC ATC CTA	1349
Met Leu Asp Tyr Arg Arg Met Leu Met Glu Asp Phe Ser Leu Ser Pro Glu Ile Ile Leu	
425 430 435 440	
AGC TGT CGG GGG GAG ATT GAA CAC CAT TGT TCC GGA TTA CAT CGA AAA GGG CGG ACC CTA	1409
Ser Cys Arg Gly Glu Ile Glu His His Cys Ser Gly Leu His Arg Lys Gly Arg Thr Leu	
445 450 455 460	
CAC TGT CTG ATG AAA GTA GTT CGA GGG GAG AAG GGG AAC CTT GGA ATG AAC TGC CAG CAG	1469
His Cys Leu Met Lys Val Val Arg Gly Glu Lys Gly Asn Leu Gly Met Asn Cys Gln Gln	
465 470 475 480	
GCG CTT CAA ACA CTG ATT CAG GAG ACT GAC CCT GGT GCA GAT TAC CGC ATT GAT CGA GCT	1529
Ala Leu Gln Thr Leu Ile Gln Glu Thr Asp Pro Gly Ala Asp Tyr Arg Ile Asp Arg Ala	
485 490 495 500	
TTG AAT GAA GCT TGT GAA TCT GTA ATC CAG ACA GCC TGC AAA CAT ATA AGA TCT GGA GAC	1589
Leu Asn Glu Ala Cys Glu Ser Val Ile Gln Thr Ala Cys Lys His Ile Arg Ser Gly Asp	
505 510 515 520	
CCA ATG ATC TTG TCG TGC CTG ATG GAA CAT TTA TAC ACA GAG AAG ATG GTA GAA GAC TGT	1649
Pro Met Ile Leu Ser Cys Leu Met Glu His Leu Tyr Thr Glu Lys Met Val Glu Asp Cys	
525 530 535 540	
GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG CAG TAT TTC ATC TCC CGG GAT TGG AAG CTG GAC CCT GTC	1709
Glu His Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu Asp Pro Val	
545 550 555 560	
CTG TAC CGC AAG TGC CAG GGA GAC GCT TCT CGT CTT TGC CAC ACC CAC GGT TGG AAT GAG	1769
Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His Thr His Gly Trp Asn Glu	
565 570 575 580	
ACC AGC GAA TTT ATG CCT CAG GGA GCT GTG TTC TCT TGT TTA TAC AGA CAC GCC TAC CGC	1829
Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His Ala Tyr Arg	
585 590 595 600	
ACT GAG GAA CAG GGA AGG AGG CTC TCA CGG GAG TGC CGA GCT GAA GTC CAA AGG ATC CTA	1889
Thr Glu Glu Gln Gly Arg Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln Arg Ile Leu	
605 610 615 620	



~~TGC TTG AAG CAA AAT AAA AAG AGT GAA TTG ATG GAT CCC AAA TGC AAA CAG ATG ATA ACC~~ 2789  
 Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr  
 905 910 915 920

AAG CGC CAG ATC ACC CAG AAC ACA GAT TAC CGC TTA AAC CCC ATG TTA AGA AAA GCC TGT 2849  
 Lys Arg Gln Ile Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys  
 925 930 935 940

AAA GCT GAC ATT CCT AAA TTC TGT CAC GGT ATC CTG ACT AAG GCC AAG GAT GAT TCA GAA 2909  
 Lys Ala Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp Ser Glu  
 945 950 955 960

TTA GAA GGA CAA GTC ATC TCT TGC CTG AAG CTG AGA TAT GCT GAC CAG CGC CTG TCT TCA 2969  
 Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala Asp Gln Arg Leu Ser Ser  
 965 970 975 980

GAC TGT GAA GAC CAG ATC CGA ATC ATT ATC CAG GAG TCC GCC CTG GAC TAC CGC CTG GAT 3029  
 Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg Leu Asp  
 985 990 995 1000

CCT CAG CTC CAG CTG CAC TGC TCA GAC GAG ATC TCC AGT CTA TGT GCT GAA GAA GCA GCA 3089  
 Pro Gln Leu Gln Leu His Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala  
 1005 1010 1015 1020

GCC CAA GAG CAG ACA GGT CAG GTG GAG GAG TGC CTC AAG GTC AAC CTG CTC AAG ATC AAA 3149  
 Ala Gln Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys Ile Lys  
 1025 1030 1035 1040

ACA GAA TTG TGT AAA AAG GAA GTG CTA AAC ATG CTG AAG GAA AGC AAA GCA GAC ATC TTT 3209  
 Thr Glu Leu Cys Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu Ser Lys Ala Asp Ile Phe  
 1045 1050 1055 1060

GTT GAC CCG GTA CTT CAT ACT GCT TGT GCC CTG GAC ATT AAA CAC CAC TGC GCA GCC ATC 3269  
 Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala Ala Ile  
 1065 1070 1075 1080

ACC CCT GGC CGC GGG CGT CAA ATG TCC TGT CTC ATG GAA GCA CTG GAG GAT AAG CGG GTG 3329  
 Thr Pro Gly Arg Gly Arg Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val  
 1085 1090 1095 1100

AGG TTA CAG CCC GAG TGC AAA AAG CGC CTC AAT GAC CGG ATT GAG ATG TGG AGT TAC GCA 3389  
 Arg Leu Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser Tyr Ala  
 1105 1110 1115 1120

GCA AAG GTG GCC CCA GCA GAT GGC TTC TCT GAT CTT GCC ATG CAA GTA ATG ACG TCT CCA 3449  
 Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met Gln Val Met Thr Ser Pro  
 1125 1130 1135 1140

TCT AAG AAC TAC ATT CTC TCT GTG ATC AGT GGG AGC ATC TGT ATA TTG TTC CTG ATT GGC 3509  
 Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu Ile Gly  
 1145 1150 1155 1160

CTG ATG TGT GGA CGG ATC ACC AAG CGA GTG ACA CGA GAG CTC AAG GAC AGG TAG 3563  
 Leu Met Cys Gly Arg Ile Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu LysA Asp Arg \*\*\*  
 1165 1170 1175 1179

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. Februar 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/011907 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 14/705, A61K 38/16, C07K 16/28 (74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried; Röntgenring 4, Postfach 63 23, 97070 Würzburg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02699 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, CN, IL, JP, RU, US.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juli 2002 (23.07.2002) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 36 009.6 24. Juli 2001 (24.07.2001) DE  
102 10 425.5 9. März 2002 (09.03.2002) DE
- (71) Anmelder und  
(72) Erfinder: MÜLLER-HERMELINK, Hans, Konrad [DE/DE]; Heinrich-Zeuner-Strasse 72, 97082 Würzburg (DE). VOLLMERS, Heinz [DE/DE]; Budapeststrasse 23, 97084 Würzburg (DE). HENSEL, Frank [DE/DE]; Am Exerzierplatz 1, 97070 Würzburg (DE).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 16. Oktober 2003
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/011907 A3

(54) Title: RECEPTOR, THE USE THEREOF, AND MOUSE ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: REZEPTOR, DESSEN VERWENDUNG SOWIE MAUSANTIKÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to a receptor located on the surface membrane of highly proliferative cells, particularly of the gastric carcinoma, which is composed of glycoproteins. At least one determinant of the glycoprotein corresponds with one of the CFR-1 protein, and the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 (IgM) specifically binds to the glycoprotein.

(57) Zusammenfassung: Rezeptor auf der Oberflächenmembran von stark proliferierenden Zellen insbesondere des Magenkarzinoms, der aus Glykoproteinen aufgebaut ist, wobei wenigstens eine Determinante des Glykoproteins mit einer des CFR-1 Proteins übereinstimmt und der humane Antikörper 103/51 und/oder der murine Antikörper 58/47-69 (IgM) am Glykoprotein spezifisch bindet.

## BOX I. I.

Although Claims 6-12 relate to a method for treatment of the human or animal body or to a diagnostic method practiced on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

## BOX I.2

Claim No: 16

Claim 16 lacks the requisite clarity (PCT Article 6) to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search (PCT Article 17(1)(a)(ii)). Claim 16 relates to "receptors according to Claim 15". Claim 15, however, is a method claim.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/705 A61K38/16 C07K16/28

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, SCISEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>HENSEL FRANK ET AL: "A new variant of cystein-rich FGF receptor (CFR-1) specifically expressed on tumor cells." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, Bd. 41, März 2000 (2000-03), Seite 698 XP001154022</p> <p>91st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.; San Francisco, California, USA; April 01-05, 2000, March, 2000</p> <p>ISSN: 0197-016X</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*8\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. August 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/08/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MOURELATOS ZISSIMOS ET AL: "Cloning and sequence analysis of the human MG160, a fibroblast growth factor and E-selectin binding membrane sialoglycoprotein of the Golgi apparatus." DNA AND CELL BIOLOGY, Bd. 15, Nr. 12, 1996, Seiten 1121-1128, XP001154021 ISSN: 1044-5498 99,7% identisch mit SEQ ID NO:6 in einem Überlappungsbereich von 1037 Aminosäuren das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-3,5-15
X	<p>HENSEL FRANK ET AL: "Mitogenic autoantibodies in Helicobacter pylori-associated stomach cancerogenesis." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 81, Nr. 2, 12. April 1999 (1999-04-12), Seiten 229-235, XP002250371 ISSN: 0020-7136 in der Anmeldung erwähnt Seite 233, linke Spalte, Zeile UNTEN; Abbildung 2</p> <p>---</p>	1-15
A	<p>VOLLMERS H PETER ET AL: "Human monoclonal antibodies from stomach carcinoma patients react with Helicobacter pylori and stimulate stomach cancer cells in vitro." CANCER (PHILADELPHIA), Bd. 74, Nr. 5, 1994, Seiten 1525-1532, XP009015348 ISSN: 0008-543X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-15
A	<p>VOLLMERS H PETER ET AL: "Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: First clinical and histopathological results." ONCOLOGY REPORTS, Bd. 5, Nr. 3, Mai 1998 (1998-05), Seiten 549-552, XP009015315 ISSN: 1021-335X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-15

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>HENSEL FRANK ET AL: "A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody." LABORATORY INVESTIGATION, Bd. 81, Nr. 8, August 2001 (2001-08), Seiten 1097-1108, XP002250372 ISSN: 0023-6837 das ganze Dokument -----</p>	1-15

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 02/02699

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
 siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☒ Ansprüche Nr. 16  
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
 siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 6-12 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers oder ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

## Fortsetzung von Feld I.2

## Ansprüche Nr.: 16

Anspruch 16 entspricht den vorgeschriebenen Anforderungen bezüglich Klarheit (Art. 6 PCT) so wenig, daß eine sinnvolle Recherche nicht durchgeführt werden kann (Art. 17(2)(a)(ii) PCT). Anspruch 16 bezieht sich auf "Rezeptoren nach Anspruch 15". Anspruch 15 ist jedoch ein Verfahrensanspruch.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



# Translation of WO 2003/011907

## Receptor, its use, and mouse antibody

The present invention relates to a receptor found on the surface of rapidly proliferating cells, particularly gastric carcinoma cells, its use, and the structure of a  
5 mouse antibody which binds specifically thereto.

Using monoclonal antibodies generated from hybridomas for clinical and scientific assays is widely known. The administration of human monoclonal antibodies produced from B-cell hybridomas is promising for the treatment of tumors, viral and  
10 microbial infections, B-cell immunodeficiencies with reduced antibody production, and other impairments of the immune system.

Gastric carcinoma is one of the most frequently occurring types of cancer worldwide. According to Lauren, "The two histological main types of gastric carcinoma," Acta  
15 Path. Microbiol. Scand. 64:331-49, it is histologically divided into diffuse adenocarcinoma and intestinal adenocarcinoma. Intestinal gastric carcinomas are often accompanied by chronic type B gastritis and particularly by intestinal metaplasias, which are considered to be precursors of dysplastic changes and of gastric carcinomas. Differences between these two types are also shown in that  
20 patients having carcinomas of the diffuse type often belong to blood group A, from which the influence of genetic factors on the cancer risk may be concluded, while environmental factors, e.g., a *Helicobacter pylori* infection, is possibly significant for the occurrence of carcinomas of the intestinal type. A reduced frequency of gastric adenocarcinoma has been established in the West, but it is now increasingly occurring  
25 in the East.

The development of stomach cancer is a multi-step and multi-factor process (Correa, 1992, Cancer Res. 52:6735-6740). Although little is known about molecular mechanisms, factors such as high salt intake, alcohol, nitrosamines, and infection with  
30 the bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) are clearly proven to be involved in the initiation of stomach carcinogenesis. Due to a strong correlation between *H. pylori* infection and the occurrence of gastritis, dysplasia, and development of gastric cancer, the bacterium has been classified as a class I carcinogen by the WHO. *H. pylori*

directly induces serious precancerous cellular changes in the mucosal environment and is also responsible for the increase of autoantibodies, which are frequently observed in gastritis and stomach cancer patients (Negrini *et al.*, 1996, Gastroenterol. 111:655-665). These antibodies are able to induce gastric lesions and apoptosis in the gastric epithelium (Steiniger *et al.*, 1998, Virchows Arch. 433:13-18). The nature of the antigens still is partially unknown. Antibodies against the gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Claeys *et al.*, 1998, Gastroenterology 115:340-347), Interleukin-8 (Crabtree *et al.*, 1993, Scand. J. Immunol. 37:65-70; Ma *et al.*, 1994, Scand. J. Gastroenterol. 29:961-965) and Lewis blood group antigens (Appelmelk *et al.*, 1997, Trends Microbiol. 5:70-73) are frequently found in stomach mucosa or stomach cancer.

Until now, the therapy has been restricted to gastrectomy and lymphadenectomy; however, due to the nevertheless poor prognosis, the need for a new accompanying therapy exists. Immunological studies have shown that even in cases in which the immune system cannot effectively combat malignant cells, cellular and humoral activity is measurable, but is not sufficient to destroy the tumor cells. An effective approach now is to isolate the antibodies arising from the immune response of the patient, reproduce them in a suitable way, and use them therapeutically. Thus, for example, antibodies originating from patients having lung, esophageal, and colon cancers are isolated and human monoclonal antibodies are derived therefrom, which, for example, directly influence differentiation and growth of the tumor cells.

Apoptosis is the programmed cell death, suicide of cells, through fragmentation of the DNA, cell shrinkage, and dilatation of the endoplasmic reticulum, followed by cell fragmentation and the formation of membrane-bound vesicles, or apoptotic bodies. Apoptosis, the physiological form of cell death, guarantees rapid and clean removal of unnecessary cells, without triggering inflammation processes or tissue trauma, as in the case of necrosis. Under pathological conditions, it is also used for removing malignant cells, such as cancer precursor cells. It may be triggered through greatly varying stimuli, such as through cytotoxic T-lymphocytes or cytokines, such as tumor necrosis factor, glucocorticoids, and antibodies. It is the most frequent cause of death of eukaryotic cells and occurs in embryogenesis, metamorphosis, and tissue atrophy. Apoptotic receptors on the cell surface, such as those of the NGF/TNF family, are

predominantly expressed on lymphocytes, but are also found on various other cell types, wherefore they are not suitable for cancer therapy. In particular, ligands and antibodies for these receptors have led to liver damage in *in vivo* tests. Therefore, tumor-specific receptors having apoptotic function are especially important.

5

In recent publications, we described that the human antibody 103/51, which was isolated from a stomach cancer patients with diffuse-type adenocarcinoma, cross-reacts with *H. pylori* and stomach cancer cells (Vollmers *et al.*, 1994, Cancer 74:1525-1532). In all assays, the known gastric adenocarcinoma cell line 23132 was used, which is deposited under No. ACC201 at the DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Mascheronder Weg 1b, 38124 Braunschweig. In low doses, the antibodies have a mitotic effect on stomach cancer cells *in vitro*, in which they bind on a 130 kD membrane receptor (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235). The antibody has some mitotic effect on stomach carcinoma cells *in vitro* by binding to a 130 kD membrane receptor (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235). Sequencing of the antibody variable gene regions identified the antibody 103/51 as an autoreactive antibody. Immunohistochemistry studies show that the antibody reacts strongly with stomach cancer cells and with glandular stomach cells.

20

The cellular receptor of monoclonal antibody 103/51 was previously unknown. In the course of the experiments leading to the present invention, we were able to identify this cellular receptor. However, this identification proved to be difficult. On one hand, the monoclonal antibody 103/51 reacts with its receptor during Western blot analysis only under very specific stringency conditions. On the other hand, non-specific reactions are found with an array of further proteins, caused by denaturing artifacts.

Sequencing analyses have shown that the receptor corresponds to the CFR-1 protein, but is not identical to this protein. Furthermore, glycoprotein compounds which have one or more determinants (ligands) corresponding to those of the known CFR-1 are thus claimed. In particular, a homology is required which is to be defined according to this application as a correspondence of at least 80% in the primary amino acid

30

sequences. The receptor is therefore an isoform to CFR-1. In addition, specific binding to either the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 is required.

- 5 It is of special interest if the specific binding site on the glycoprotein is a carbohydrate residue, i.e., a sugar residue.

In a special embodiment, the CFR-1 protein has an amino acid sequence according to Appendix S, cell line 23132 as a determinant.

10

- The cellular receptor of the antibody 103/51 is an isoform of the protein CFR-1, specific for tumor cells, particularly for gastric carcinoma cells, which does not occur in normal tissue. The specific receptor properties of this isoform are based on a special glycostructure linked to the protein backbone via an N-linkage. The tumor-specific receptor may be used in a screening method for identifying specific binding partners. According to the present invention, specific binding partners on the receptor are those compounds which bind selectively to a tumor-specific glycostructure of CFR-1 and preferably have the ability to induce apoptosis. These specific binding partners may be used for the production of therapeutic agents for the treatment of tumors and for the production of diagnostic agents.
- 15  
20

- The protein compound was characterized as an isoform of CFR-1 through purification, sequencing, and transfection. The specificity for the antigen 103/51 was confirmed by producing murine antibodies from purified molecules having identical reactions and functions, through immunohistochemical staining, and an MTT assay of two CFR-1 negative cell lines. The isoform of the CFR-1 molecule, which was detected by both the human and the murine antibodies, is localized in the cell membranes of the epithelial cells and has an expression pattern which differs from that previously described for CFR-1 (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:5600-5609).
- 25  
30

CFR-1, which was isolated as a high-affinity FGF-binding protein from chicken fibroblasts (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:5600-5609), binds to a number of

FGFs and may have a role in the regulation of cellular proliferation. In Chinese hamster ovary cells (CHO), CFR-1 was found to be expressed only in the Golgi apparatus (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:5600-5609), but it can also be secreted in a mutated form (Zuber *et al.*, 1997, J. Cell Physiol. 170:217-227).

5 Depending on the organism, two detected variants of CFR-1, ESL-1, and MG-160 share sequence homologies between 80% and 95% (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:5600-5609; Stieber *et al.*, 1995, Exp. Cell Res. 219:562-570; Steegmaier *et al.*, 1995, Nature 373:615-620; Mourelatos *et al.*, 1996, DNA Cell Biol. 15:1121-1128) and do not appear to share any sequence homologies to other known proteins.

10 Function and cellular distribution of CFR-1 and the homologues is relatively unknown and contradictory. It has been shown that MG-160, which is a medial Golgi sialoglycoprotein and was purified from rat brains, plays a role in intracellular FGF trafficking (Zuber *et al.*, 1997, J. Cell Physiol. 170:217-227).

15 Recent findings have shown that the localization of this protein is not restricted to the Golgi apparatus. However, if truncated at the c-terminus, the protein can be localized to the plasma membrane and filopodia (Gonatas *et al.*, 1998, J. Cell Sci. 111:249-260). This is consistent with the finding that the third homologue, ESL-1, which was isolated from mouse neutrophilic progenitor cells (32Dcl3), is located in the Golgi

20 apparatus as well on the cell surface of the microvilli (Steegmaier *et al.*, 1997, J. Cell Sci. 110:687-694, Gonatas *et al.*, 1998, J. Cell Sci. 111:249-260). ESL-1 was identified as ligand for E-selectin in neutrophils with an approximate molecular mass of 150 kD. Immunoprecipitation with anti ESL-1 antibodies showed that a non-defined isoform of this protein could be precipitated from various cells, including

25 some cancerous cell lines (Steegmaier *et al.*, 1995, Nature 373:615-620).

Because of the predominantly membranous distribution of CFR-1 in cancerous cells, we conclude that the described receptor is an isoform of CFR-1. A variable cellular distribution of CFR-1 and its homolog is probably responsible for the results cited and

30 is a known phenomenon for other proteins (Smalheiser, 1996, Mol. Biol. Cell 7:1003-1014). An altered distribution might be caused by a different glycosylation pattern in malignant cells, which may lead to a transport to the plasma membrane.

The tissue distribution shows that the CFR-1 molecule is correlated with cellular activation and proliferation demonstrated by staining with antibody Ki67 (Ramires *et al.*, 1997, J. Pathol. 182:62-67). Normal stomach mucosa does not express this  
5 receptor in a measurable amount, but *H. pylori* infiltrated epithelia and dysplastic epithelia have this antigen. Both tissues proliferate and may be precursors for gastric carcinoma.

To understand the high effectiveness, it is important to note that in contrast to the  
10 structure of CFR-1, which is found in healthy cells, the characterized isoform is not found on healthy cells, but exclusively on rapidly proliferating cells, i.e., cells which rapidly divide, such as the tumor cells found in the growth and corresponding precursor stages. The function of the receptor is essentially based on it being used as  
15 an energy receptor for nutrition intake of the cells and having a dominant share particularly in frequently dividing cells, such as carcinoma cells. It is to be expressly noted that this receptor will have applications not only in gastric carcinomas, but rather also for all epithelial tumors which have essentially the same reaction mechanisms. Besides gastric tumors, the existence of these receptors was proven in  
20 cancerous tissue of the following tumors: esophagus, stomach, intestines, rectum, liver, gallbladder, pancreas, lungs, bronchi, breast, cervix, prostate, cardiac, Barrett's, ovary, and/or uterus. The antibodies effective on the tumors, which bind to the receptor according to the present invention, therefore have a targeted activity on the cancerous (and not the healthy) cells.

25 The glycoproteins of the receptor structure were able to be identified via their molecular mass of approximately 130 kD, the molecular mass able to be determined using a known method, for example, using gel electrophoresis. The term "approximately" is based on the fact, recognizable to one skilled in the art, that these types of size determinations are not exact in any way, but rather changes or variations  
30 of the methods of the molecular size determination lead to variations in the measurement values.

The most significant field of application of the receptor is diagnosis and therapy. For prophylactic application, the receptor is administered to the patients in pharmaceutical doses, with the goal of stimulating antibodies, so that vaccination may be achieved with the aid of the receptor. The antibodies are responsible for removing any tumor  
5 cells which arise.

However, the administration of the receptor if tumor cells are already present is also a possibility for medication. The administered receptors reinforce and amplify antibody formation and therefore are responsible for elevated apoptosis of the tumor cells or for  
10 a complement-mediated lysis. The cells "starve," since blocking of the receptor leads to growth arrest.

The assays up to this point have shown that the receptor has been proven particularly suitable for treating the following tumor precursors. In regard to illnesses of the  
15 stomach, the receptor is suitable for treating dysplasia of the gastric mucosa and/or intestinal metaplasia of the stomach and/or for treating inflammation of the gastric mucosa which is associated with the bacteria *Helicobacter pylori* and for treating tubular and tubulovillous adenomas of the stomach. Application is also indicated for the following diseases of the colon, specifically tubular adenoma of the colon, villous  
20 adenoma of the colon, and dysplasia in ulcerative colitis. The receptor is also suitable for Barrett's dysplasia and Barrett's metaplasia of the esophagus. The receptor is also suitable for treating the following diseases of the cervix: cervical intraepithelial neoplasia I, cervical intraepithelial neoplasia II, and cervical intraepithelial neoplasia  
25 III.

Finally, the receptor described above is also suitable for administration with squamous epithelial metaplasia and squamous epithelial dysplasia of the bronchus.

Due to the operative mechanisms described above, the receptor is suitable in principle  
30 for treating tumors of the esophagus, the stomach, intestine, the rectum, the liver, gallbladder, pancreas, lungs, bronchi, breast, cervix, prostate, cardiac, Barrett's, ovary, and/or uterus.

The application of the receptor for diagnosis purposes uses the ability of the antibody to bind to this receptor due to the specific antigen/antibody interaction. In this way, evidence for the existence, the localization, and/or the quantity of the corresponding antibodies may be derived from the ability to bind to the receptor. With the same  
5 reaction mechanisms, the binding ability may be used to detect the receptor.

Particularly if the antibodies are tumor antibodies, they may be used to detect the existence of tumors. In particular, it is possible to use the receptor as a tumor marker.

10 In a refinement, the receptor may be used to produce an antitumor agent, in which compounds that are potentially effective against tumors are assayed for their ability to specifically bind to the receptor and upon a positive result, i.e., upon the occurrence of binding, this compound is used for the pharmaceutical application. Of course, appropriate formulation and the addition of typical additives is necessary, as usual, for  
15 producing a pharmaceutical which reaches the market.

It remains to be expressly stated that not only human antibodies come into consideration for the production of antitumor medications with the aid of the receptor as described above, but rather also mouse antibodies and/or humanized antibodies of  
20 any arbitrary species. This is also true for antibody fragments such as Fab and F(ab)<sub>2</sub> and/or Fab' fragments, as are obtained through proteolytic cleavage of antibodies. These also include single strand antibodies and/or tetrameric and/or dimeric antibody forms and/or bispecific antibodies.

25 Furthermore, it is known that human tumor antigens which are immunogenic in mice are used for generating monoclonal mouse antibodies and are capable of specifically recognizing the human antigen and therefore are suitable for being used therapeutically in humans.

30



The object of the present invention is the establishment of the receptor structure and its use. However, the repeated injection of "foreign" antibodies and/or mouse antibodies into humans is problematic as it leads both to disadvantageous hypersensitivity reactions and to elevated clearance rate of the circulating antibodies, so that the antibodies do not reach their target location.

For these reasons, reexamination of the therapeutic suitability of mouse antibodies is required. Nonetheless, the suitability in connection with diagnostic methods is unrestricted. The possibility of deriving humanized mouse antibodies and using them for therapeutic purposes also exists. It is also decisive that not only existing tumors, but also pre-cancerous structures may be characterized with the aid of these diagnostic methods.

In addition to the receptor described above, protection is also claimed for a mouse antibody which binds specifically thereto, whose structure is defined by Appendices A and B. The regions identical for all antibodies were not reproduced; those regions characteristic for the individual antibody were claimed and shown.

As a result, the receptor whose structure is described, which should be designated as an isoform of CFR-1, enables the therapy and diagnosis not only of tumors, but also of pre-cancerous structures. In addition, the structure of a mouse antibody which binds specifically thereto is described.

## **Material and Methods**

25

### **Cell culture and antibody purification**

For all assays, the established stomach adenocarcinoma cell line 23132 (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235) was used. Cells were grown to 80 % confluency in RPMI-1640 (PAA, Vienna, Austria) supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin (1% for both). For the assays described, cells were detached with trypsin/EDTA and washed twice with phosphate buffered saline (PBS) before

use. The human hybridoma cell line 103/51 was produced and grown as described (Vollmers *et al.*, 1994, Cancer 74:1525-1532). Purification of the IgM antibodies was performed as described elsewhere (Vollmers *et al.*, 1998, Oncol. Rep. 5:549-552).

## 5 **Preparation of membrane extracts**

Isolation of membrane proteins from tumor cells was performed as described by Hensel *et al.* (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235), using cell line 23132. In short, confluent tumor cells were washed twice with PBS, harvested with a cellscraper and centrifuged, and resuspended in hypotonic buffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>). After 15 min incubation on ice, followed by sonification for 5 min, the nuclei were pelleted by centrifugation at 10,000g for 10 min. The supernatant was centrifuged for 30 min at 100,000g in a swing-out rotor to pellet membranes. After washing the pellet with hypotonic buffer, it was resuspended in membrane lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, and 1% Triton X-100). A protease inhibitor (Boehringer, Mannheim, Germany) was added to all solutions.

## **Western blotting**

10% reducing SDS-PAGE gels and Western blotting of proteins were performed using standard protocols as described elsewhere (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235). In short, blotted nitrocellulose membranes were blocked with PBS containing 2% low fat milk powder, followed by 1 h incubation with 10 µg/ml purified antibody 103/51. The secondary antibody (peroxidase-coupled rabbit anti-human IgM antibody (Dianova, Hamburg, Germany)) was detected with the SuperSignal chemiluminescence kit from Pierce (KMF, St. Augustin, Germany). After three washings with PBS + 0.05% Tween-20, the second antibody (peroxidase-coupled rabbit antihuman IgM antibody (Dianova, Hamburg, Germany)) was incubated. The reaction was detected with the aid of the SuperSignal chemiluminescence kit from Pierce (KMF, St. Augustin, Germany).

## 30 **Purification of the antigen 103/51**

The purification of the antigens were performed by column chromatography using a Pharmacia (Freiburg, Germany) FPLC unit. For size exclusion chromatography, a Pharmacia Superdex 200 column (XK16/60) was loaded with 5 mg membrane

preparation and run with buffer A (100 mM Tris/Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 40 mM NaCl, 1% Triton X-100). Then, the eluate was fractionated and examined in Western blot analysis for reaction with antibody 103/51. Positive fractions were loaded on a MonoQ (5/5) column using buffer A. The bound proteins were eluted with a linear  
5 gradient using buffer B (100 mM Tris/Cl, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% Triton X-100), fractionised and examined in Coomassie-stained SDS-PAGE and Western blot analysis. Positive bands were cut out from gel and sequenced or used for immunization of mice.

#### 10 **MALDI peptide mapping**

The band of interest was excised and cut into small pieces of about 1 mm x 1 mm. Gel pieces were washed, reduced with DTT, S-alkylated with iodoacetamide, and in-gel digested with trypsin (unmodified, sequencing grade, Boehringer) as described elsewhere (Shevchenko *et al.*, 1996, Anal.Chem. 68:850-858). After 3 h of digestion  
15 at 37°C, 0.3 µl of the digest solution was removed and subjected to MALDI peptide mass mapping on a Bruker Reflex MALDI-TOF equipped with delayed extraction (Bruker-Franzen, Bremen, Germany). The thin film technique was adopted for sample preparation (Jensen *et al.*, 1996, Rapid.Communicat.Mass.Spectrom. 10:1371-1378). The tryptic peptide masses were used to search a non-redundant protein sequence database  
20 by the PeptideSearch software program developed in-house.

#### **Cloning of CFR-1 anti-sense vector and transfection**

RNA isolation, cDNA synthesis, and PCR were performed as described (Hensel *et al.*, 1999, Int.J.Cancer 81:229-235). In short, for PCR for amplification of a 897 bp  
25 fragment ranging from basepairs 802 to 1699, the following primers were used: CFR-For 5' GCTTGGAGAAAGGCCTGGTGAA 3', CFR-Rev 5' TGGCACTTGCGGTACAGGACAG 3'. Amplification was performed using the following cycle profile: 95°C, 2 min, followed by 35 cycles of 94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 60 sec, and a final extension of 72°C for 4 min. Cloning into the pCR-  
30 Script Amp SK (+) vector and DNA sequencing were performed as described before (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235). The insert was subcloned into the pHook-2 vector (Invitrogen, Leek, Netherlands), and cloning was controlled again by sequencing.

Transfection of cell line 23132 with pHOOK2-antiCFR-1 was accomplished with PrimeFactor reagent (PQLab, Erlangen, Germany) according to supplier's manual. In short, plasmid DNA was diluted to 10 µg/ml and the prime factor reagent was added in a 1:10 ratio to a serum-free growth medium. Diluted plasmid DNA (450 µl), diluted Primefactor reagent (90 µl), and serumfree medium (460 µl) were mixed and incubated at RT. 60-milliliter cell culture plates (70% confluent) were washed two times with serumfree medium, and then the PrimeFactor/DNA mixture was added dropwise. Cells were incubated 18 h at 37°C and 7% CO<sub>2</sub>, then serumfree growth medium was replaced with growth medium containing 10% FCS, and cells were incubated another 24 h before studying CFR-1 expression.

### **Flow cytometry**

The cell line 23132 was detached from culture plates by trypsin /EDTA 48 h after transfection, washed and subsequently incubated on ice with antibody 103/51 and human) isotype-matched control antibody (Chromopure human IgM) for 15 minutes, followed by incubation with a FITC-labeled rabbit anti-human IgM antibody (Dianova) for 15 minutes on ice. Antibodies were optimally diluted in PBS containing 0.01% sodiumazide. Cells were analyzed by flow cytometry (FACScan; Becton Dickinson, USA).

### **Glycosidase assays**

Detached and washed cells were resuspended in RPMI-1640 containing 10% FCS and incubated for 1 h on ice, then counted, and cytopins were prepared. After air-drying, cytopsin preparations were acetone-fixed (10 min), washed, and incubated with 20 µU/ml O-glycosidase or 5 mU/ml N-glycosidase (Boehringer) for 4 h at 37°C. Then, slides were washed and immunohistochemically stained.

For deglycosylation of membranous proteins, membrane extracts were incubated for 16 h at 37°C with 1 mU/ml N-glycosidase diluted in deglycosylation buffer (50 mM PO<sub>4</sub>-Buffer, pH 7.4). As a control, extracts were incubated with deglycosylation buffer alone. Then, extracts were separated by SDS-PAGE and Western blots were performed as described above.

### **Production of murine monoclonal antibodies**

BALB/c mice were immunized two times within 17 days with 5 µg purified antigen of antibody 103/51, and killed 4 days after the second immunization. Spleens were  
5 disrupted mechanically and fused with  $1 \times 10^7$  NS0 cells as described earlier (Vollmers *et al.*, 1985, Cell 40:547-557). Antibody-producing hybridomas were tested through immunohistochemical staining and reaction in Western blot analysis. Clone 58/47-69 with positive reactivity was used for further experiments.

### **10 Immunohistochemical staining of paraffin sections**

Paraffin-embedded human gastric mucosa and tumor were sectioned (5 µm), deparaffinized, and blocked with BSA (15 mg/ ml) diluted in PBS for 30 min. The sections were incubated with supernatant of hybridoma 103/51, or 58/47-69, Ki67 (Loxo, Dossenheim, Germany) or mouse anti-cytokeratin 8 antibody diluted 1:15 with  
15 BSA/PBS (Dako, Hamburg, Germany) for 2 h in a humidified incubator. Then they were washed three times with Tris/NaCl, followed by incubation with peroxidase-labeled rabbit anti-human or rabbit anti-mouse conjugate (Dako) diluted 1:50 in PBS containing rabbit serum (for antibody 103/51) or in PBS containing human AB plasma (for antibody 58/47-69 and anti-cytokeratin). After washing three times with  
20 Tris/NaCl and incubation in PBS for 10 min staining was performed with diaminobenzidine (0.05%)-hydrogen peroxide (0.02%) for 10 min at RT. The reaction was stopped under running tap water, and sections were counterstained with hematoxylin.

### **25 Immunohistochemical staining of living and acetone-fixed cells**

For living cell staining, cells were detached, washed and diluted to  $1 \times 10^6$  cells/ml. 1 ml of cell suspension was centrifuged at 1,500g for 5 min. Antibody diluted to 40 µg/ml with complete RPMI was added to a final volume of 1 ml and incubated for 90 min on ice. Then cells were pelleted at 1,500g for 5 min and resuspended with 500 µl  
30 RPMI. With 200 µl of the cell suspension, cytospin preparations were prepared and air-dried for 30 min. Cells were fixed in acetone for 30 min and washed with

Tris/NaCl three times. HRP-coupled rabbit anti human IgM (DAKO) was diluted 1 : 50 in PBS/BSA (0,1 %) and incubated for 30 min at RT. After three washings, staining was performed as mentioned above.

- 5 For staining of acetone-fixed cells, cytopins were prepared, air-dried at RT and fixed in acetone as described above. Then, cytopins were blocked for 15 min with PBS/BSA (0.1 %) and incubated for 30 min with 10 µg/ml primary antibodies followed by three washings. Incubation with secondary antibody and staining was performed as described above.

10

#### **MTT-proliferation assay**

- The MTT-assay with the established cell line 23132 was performed as described (Vollmers *et al.*, 1994, Cancer 74:1525-1532). In short, trypsinized cells were diluted to  $1 \times 10^6$  cells/ml in complete growth medium, and 50 µl of cell suspension was added to each well of a 96-well plate. Then 50 µl of the antibodies, diluted to the indicated concentrations with complete growth medium, were added to the wells, and plates were incubated for one or two days at 37°C in a humidified incubator. For measurement, 50 µl of MTT (3(4,5 dimethylthiazol)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) solution (5 mg/ml) were added to each well, and plates were incubated for 30 min. After incubation, plates were centrifuged at 800g for 5 min, MTT solution was removed, the stained cell pellet was dissolved in 150 µl dimethylsulphoxide, and absorption was measured at wavelengths of 540 nm and 690 nm.
- 15
- 20

#### **Methods of determining the sequence of CFR-1**

25

- RNA was prepared for the cDNA synthesis with the aid of the RNeasy kit from Quiagen. For preparation,  $1 \times 10^6$  cells were washed twice using ice cold PBS and pelletized at 1000 x g for 5 minutes and the RNA was prepared in accordance with the manufacturer description. 5 µg RNA (1-5 µl solution) was mixed with 1 µl oligo-dT<sub>15</sub> (1 µg/µl) and 2 µl random primer (40 µM) and filled up to a total volume of 8 µl using H<sub>2</sub>O. The RNA was denatured for 10 minutes at 65°C and the sample was subsequently cooled on ice. 17 µl Mastermix, consisting of 5.2 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 5 µl 5x
- 30

reverse transcriptase buffer, 2.5 µl dNTPs (per 10 mM), 2.5 µl DTT (250 mM), 0.8 µl RNasin (400 U), and 1 µl M-MLV reverse transcriptase (200 U), was then pipetted thereto. The synthesis of the cDNA was performed for 70 minutes at 37°C and was subsequently terminated by heating to 95°C for 5 minutes. 1-5 µl of the cDNA was mixed with the PCR Mastermix and filled up to 25 µl total volume using H<sub>2</sub>O. The PCR Mastermix consisted of 2.5 µl 10x Taq-polymerase buffer, 0.5 µl 10 mM NTPs, 1.5-2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl each 20 pM 3' and 5' primer, and 0.2 µl Taq polymerase (1 U). The amplification conditions for the various PCR products are listed in the following table.

10

Overview of the PCR program used for amplifying the various cDNAs

Product	Annealing in [°C]	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Extension time [seconds]	Cycles	Product size [bp]
Fragment 1	55	1.75	45	40	691
Fragment 2	60	1.5	45	40	898
CFR Fragment 3	55	2.0	45	40	739
Fragment 4	55	2.0	45	40	941
Fragment 5	55	2.0	45	40	750

### Primer sequences

15 Sequences for the oligonucleotides used for the PCR

#### CFR

	CFR-For 1	5'	OGC AGC TTC AGC AGC AAC AGC A	3'
	CFR-Rev 1	5'	CAG CTC AGC CAC CCG GAG AAT G	3'
20	CFR-For 2	5'	GCT TGG AGA AAG GCC TGG TGA A	3'
	CFR-Rev 2	5'	TGG CAC TTG CGG TAC AGG ACA G	3'
	CFR-For 3	5'	GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG C	3'
	CFR-Rev 3	5'	GCT TCC TGC AGA GTG TCA TTG C	3'
	CFR-For 4	5'	GGA GGA CGT GTT GAA GCT TTG C	3'
25	CFR-Rev 4	5'	CCA GGG CAC AAG CAG TAT GAA G	3'

CFR-For 5	5'	CAA CAG CAG ACA GGT CAG GTG G	3'
CFR-Rev 5	5'	CCG GAA GTT CTG TTG GTA TGA G	3'

The sequencing was performed using a sequencer from the firm Applied Biosystems.

- 5 The following oligos were used for the sequencing of cloned PCR products:

T <sub>3</sub>	5'	ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG	3'
T <sub>7</sub>	5'	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	3'

- 10 3 µl plasmid DNA was mixed with 1 µl primer (3.2 pM), 11 µl H<sub>2</sub>O, and 5 µl reaction mixture of the AbiPrism Sequencing Kit and incubated in the thermocycler for 25 cycles using the following parameters:

	<u>Denaturing</u>	<u>Annealing</u>	<u>Extension</u>
15	95°C, 30 seconds	52°C, 15 seconds	60°C, 4 min.

- 20 To remove oligos and dNTPs, the reaction mixture was purified via a Sephadex G-50 column. For this purpose, a 100 µl pipette tip was loaded up to the upper edge with column material and centrifuged for 3 minutes at 2000 x g. Subsequently the sample was applied and the small column was centrifuged again. The DNA was then precipitated by 2 µl Na acetate (pH 5.2) and 50 µl 100% ethanol and pelletized by centrifuging at 13,000 x g for 15 minutes. After drying, the DNA was received in 3 µl formamide/25 mM EDTA (5:1) and analyzed in the sequencer.

## 25 Analysis of the Sequencings

- 30 At least five clones were sequenced from all clonings. In order to remove errors which arose during the amplification using the Taq-polymerase and/or the sequencing, the sequences of the cloned PCR fragments were compared with one another with the aid of the DNAsis for Windows software and a consensus sequence of all clones was established from both read directions. By rewriting the DNA sequences into amino acid sequences, the number of silent mutations and amino acid



substitution mutations were determined. The sequences for MG160 and CFR were drawn from the NCBI databank and compared to sequencings of the PCR products using the DNAsis for Windows program.

## 5 **Figures and Tables**

### **Figures and Tables**

**Fig. 1:** Identification of the antigen of antibody 103/51

- 10 a) Protein purification of the antigen from membrane extracts of stomach carcinoma cell line 23132. Membrane fractions were processed by chromatographic procedures and whole membrane fraction (lane 2), or purified proteins (lane 3) were stained with Coomassie (lane 1: 10 kDa ladder). Western blot analysis with antibody 103/51 on membrane fractions of cell line 23132 showed one reaction with a protein with a molecular mass of
- 15 approximately 130 kD (lane 4). Specificity of processed membrane extracts was controlled by Western blotting with 103/51 (lane 5). The protein band indicated by the arrow was excised from a preparative gel and used for MALDI mass mapping and immunization of mice.
- 20 b) Identification of the 130 kDa gel-separated protein by high resolution MALDI peptide mass mapping. Peaks labeled with '\*' match the calculated masses of tryptic peptides of U28811 human cysteine-rich fibroblast growth factor receptor (CFR-1) with a mass accuracy better than 50 ppm. Peaks labeled with 'T' correspond to trypsin autolysis products. The inset shows the mass resolution ( $m/\Delta m = 9000$ ) of the peak at  $m/z$  1707.818.

25

**Fig. 2:** Effect of CFR-1 antisense transfection on antibody 103/51 staining and live cell staining (Magnification 200x)

- 30 a) Cell line 23132 transiently transfected with control vector and acetone fixation shows intensive staining with antibody 103/51.
- b) Reduced staining is visible in cells transiently transfected with CFR-1 antisense vector.

- c) To reduce background staining in immunohistochemical staining, live cell staining was performed with cell line 23132. A clear membrane staining is visible.
- d) Control live cell staining (only secondary antibody) on cell line 23132.
- 5 e) Negative live cell staining on cell line Colo-699 with antibody 103/51 indicates that this cell line is negative for expression of CFR-1.
- f) Control live cell staining (only secondary antibody) on cell line Colo-699.
- g) Flow cytometry of cell line 23132 with antibodies Chromopure human IgM (grey) and 103/51
- 10 h) Analysis of cells transfected with control vector pHOOK-2 with flow cytometry 48 h after transfection.
- i) Cells transfected with CFR-1 antisense vector shows a clear decrease in binding of antibody 103/51

15 **Fig. 3: Effect of deglycosylation on staining with antibody 103/51**

- a) Cells (23132) incubated with deglycosylation buffer and acetone-fixed show intense staining with antibody 103/51.
- b) Cells (23132) treated with N-glycosidase followed by acetone fixation show a clear reduction in staining.
- 20 c) Effect of deglycosylation of membrane extracts of cell line 23132 on reaction with antibody 103/51 in Western blot analysis. Extracts incubated for 16 h with deglycosylation buffer (Buffer) show no difference in staining to untreated extracts (Control). Incubation with N-glycosidase leads to a clear reduction in staining (N-glyco).

25

**Fig. 4: Immunohistochemical staining with murine antibody 58/47-69 and 103/51 on stomach adenocarcinoma**

- To show identical specificity of antibody 103/51 and murine antibody 58/47-69, diffuse-type stomach adenocarcinoma was stained with haematoxylin-eosin
- 30 (a), antibodies 103/51 (b) and 58/47-69 (c), and anti-cytokeratin 18 as a positive control. Identical staining in (c) and (d) indicates identical specificity (arrows = tumor cells).

**Fig.5: Immunohistochemical staining of antibody 103/51 on different gastric tissues**

Cryo-sections of gastric tissues were stained by HE, antibody Ki67 (to indicate proliferating cells) and antibody 103/51. (Magnification x100)

- 5 a) gastric tissue with inflammation
- b) *H. pylori* induced gastritis (inlets shows magnification of marked glands.
- c) Dysplasia
- d) Gastric adenocarcinoma

10 **Fig. 6: Immunohistochemical staining with antibody 103/51 on different cancerous and normal tissues**

The staining of antibody 103/51 on the following tissues is shown: Carcinoma of the ampulla of Vater (a), mamma carcinoma invasive lobular (b), adenocarcinoma of the colon and no staining of normal beaker cell epithelium of the colon (c), hepatocellular carcinoma (d), glomerular and fascicular zones of the adrenal gland (e), collecting tubes of the kidney-specific staining of the Golgi apparatus (arrow) (f). Arrows in a - d indicate tumor cells, the red arrow in (c) = beaker cells, the arrow in (f) indicates Golgi apparatus (Magnification 400x, except (g) 200x).

20

**Fig. 7: Stimulation of cell lines with antibodies 103/51 and 58/47-69 determined by colorimetric MTT-assay**

- 25 a) Titration with purified antibody 103/51 shows an increase in stimulation up to 4 µg/ml. Higher concentrations do not lead to higher stimulation (c = Control, no antibody added).
- b) A MTT-assay with equal concentrations (4 µg/ml) of purified antibodies 103/51 and 58/47-69 shows comparable stimulation of tumor cell 23132 after one or two days of incubation (Control 1 = chromopure human IgM, Control 2, uncorrelated mouse IgM).
- 30 c) Cell line 23132 was transiently transfected with control vector pHOOK-2 or CFR-1 antisense vector, incubated for 24 h, and tested in the MTT assay for stimulation with 4 µg/ml purified antibody 103/51 after 24 h. Untransfected cells were also incubated as control (Control, uncorrelated human IgM).

d) A MTT-assay, with equal concentrations (4 µg/ml) of antibody 103/51, on different epithelial tumor cell lines shows stimulation only on the CFR-1-positive cell line 23132 24 h after addition of antibody. CFR-1-negative cell lines Colo-699 and EPLC-272H do not show any stimulation by antibody 103/51.

**Tab. 1:** Reaction pattern of antibody 103/51 with different tissues

Antibody staining was scored as followed: - = no staining, + = moderate staining, ++ = intensive staining. HCC = hepatocellular carcinoma, <sup>1</sup> Proliferation zone, Glandular foveola, <sup>2</sup> Glomerular, fascicular zone (membranous staining), <sup>3</sup> Collecting tubes of the endoplasmatic reticulum.

#### Appendix A

#### Appendix B

Appendix S: comparison of the amino acid sequences of the CFR-1 obtained from cell line 23132 to the sequences of CFR-1 and MG160 already published.

These experimental comparisons primarily show that the CFR-1 protein obtained from cell line 23132 is not identical to the CFR-1 sequences previously known, but represents an isoform thereof. In addition to the differences in relation to the previously known and published CFR-1 and MG160, the amino acid sequence is seen as a special embodiment of the generally claimed receptor and is uniquely characterized by the first and specially identified positions.

## Results

### Purification and identification of antigen 103/51

Western Blot analysis was used to show that the antibody 103/51 binds to an approximately 130 kD membrane protein on stomach cancer cells. We prepurified this protein by sequential size exclusion and anion exchange chromatography (Fig. 1 a). The protein was excised from a Coomassie-stained preparative SDS-PAGE, one part was used for production of mouse monoclonal antibodies (see below), and one part was used to identify the protein using the method outlined by Shevchenko et al.

(1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14440-14445). After 3 h of *in-gel* digestion with trypsin, about 1% of the total digested volume was removed and subjected to high mass accuracy MALDI peptide mass mapping (saving the rest of the digest for nanoelectrospray analysis, in case MALDI MS did not lead to definitive identification). Despite the femtomole amount of the protein digest consumed for MALDI analysis, a database search matched 35 peptides to the CFR-1 sequence with a mass accuracy within 50 ppm. These peptides cover 29% of the CFR-1 sequence, thus definitively identifying the protein, which has a calculated molecular weight of approximately 134 kD (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell Biol. 12:5600-5609) (Fig. 1 b).

10

**Effect of transient transfection of cell line 23132 with CFR antisense vector on binding of antibody 103/51 and live cell staining**

We investigated the effect of an antisense transfection of the stomach carcinoma cell line 23132 using immunohistochemistry and flow cytometry. For this, an 897 bp PCR-fragment of CFR, flanking the region between basepairs 802 and 1699, was cloned into the pHOOK-2 vector in an antisense direction in reference to the CMV promoter. The washed cells were transfected with the pHOOK-CFR anti-sense vector, pHOOK-lacZ, and pHOOK vector in an intermediate step. Transfection was controlled by a  $\beta$ -Galactosidase assay (data not shown). 48 h after transfection, cytospin preparations were prepared and stained with antibodies 103/51 and anti-cytokeratin 18 as a control (data not shown).

The immunohistochemistry showed a clear reduction of staining in cells transfected with the pHOOK-CFR antisense vector when compared to mock-transfected cells (Fig. 2 a - b). This confirmed the binding of antibody 103/51 to CFR-1. The slight cytoplasmatic staining visible in both stainings might be due to nonspecific binding often observed in staining with human IgM antibodies on acetone-fixed cells. Membrane expression and the effect of transfection were also tested by flow cytometry. (Fig. 2 g - i). The data indicates a reduction in binding of the antibody 103/51 after transfection of cells with the CFR-1 antisense vector. However, untreated cells or cells transfected with the control vector pHOOK-2 shows a clear binding to cell line 23132, indicating expression of CFR-1 on the cell membrane.

To investigate the specific membrane distribution of the CFR-1 isoform, we performed live cell staining with cell line 23132 and some non-stomach cancer cell lines. On the cell line 23132 we found a clear staining (Fig. 2 c, d), while the human lung adenocarcinoma cell lines Colo-699 (Fig. 2 e, f) and human epidermoid lung carcinoma cell line EPLC-272H (data not shown) were clearly negative. This data show that the described CFR-1 isoform is not expressed in all cancerous cell lines, and the exclusive membrane staining of 23132 cells indicates that the CFR-1 isoform seems to have a distribution different from the one described so far for CFR-1.

### **Glycosidase assay**

CFR-1 is a sialoglycoprotein with 5 possible N-glycosylation sites, and it has been shown shown by treatment with glycosidase F that the molecule is glycosylated at these sites (Steedmaier *et al.*, 1995, Nature 373:615-620). Since tumor-reactive antibodies often react with carbohydrate residues, we investigated whether this is the case for the antibody 103/51. Cytospin preparations of cell line 23132 were incubated for 4 h with O- and N-glycosidases, and then subjected to immunohistochemical staining with antibody 103/51. Treatment of cells with N-glycosidase led to a dramatic decrease in 103/51 staining (Fig. 3 b), while incubation with dephosphorylation buffer (Fig. 3 a) or digestion with O-glycosidase (data not shown) had no effect on binding of the antibody 103/51. This shows that the specificity of binding of the antibody 103/51 must be located in sugar residues and not in the primary protein sequence.

To further control for this effect, membrane extracts of cell line 23132 were deglycosylated for 16 h and Western blots were prepared and stained with antibody 103/51. We found a reduction in the reaction on lysates incubated with N-glycosydase when compared to the control lysates (Fig. 3 c).

### **Production of murine antibodies and immunohistochemical staining of paraffin section of stomach adenocarcinoma**

Since commercial antibodies to CFR-1 are not available, we immunized mice with purified protein eluted from Coomassie-stained SDS-gel for production of

monoclonal antibodies to strengthen the specificity, and to further characterize CFR-1 expression. Spleen cells were immortalized by fusion with the heteromyeloma NS0. 150 clones were tested for immunohistochemical staining. Positive clones were recloned, and the clone 58/47-49 (IgM) was used for further characterization. To investigate the binding properties of the human antibody 103/51 and the murine antibody 58/47-69, we stained paraffin sections of 15 different stomach adenocarcinoma and one adenoma. Identical staining of glandular cells of the normal epithelial tissue and intensive staining of carcinoma cells was found (Fig. 4). In short, early carcinoma (n = 2) were stained by both antibodies. On intestinal-type carcinoma both antibodies stained 4 out of 5 cases, on diffuse-type carcinoma all cases (n = 4) were stained, and the intermediary-type were positive in 50 % (n = 4) with both antibodies. These results show a high expression of CFR-1 in most cases of stomach carcinoma. The investigated adenoma showed a distinct staining pattern, with positive cells only in the transition from normal to transformed cells.

15

#### **Immunohistochemical staining with antibody 103/51 on gastric mucosa**

To investigate the reaction pattern of antibody 103/51 on gastric mucosa in more detail, we performed immunohistochemical stainings on gastric tissue without inflammation, *H. pylori* associated chronic active gastritis, high-grade dysplasia and gastric adenocarcinoma. On non-inflamed gastric tissue no reaction was seen (Fig. 5). However, in the mucosa of a patient with *H. pylori* gastritis we found staining predominantly in the basal zone of foveolar cells. The staining pattern of antibody 103/51 shows a strong correlation with the activation pattern shown by Ki67 staining (Ramires *et al.*, 1997, J. Pathol. 182:62-67). A more intensive staining of antibody 103/51 was seen in the proliferation zone of gastric dysplasia also correlating with Ki67 staining. The strongest staining was found in the proliferating zone of gastric adenocarcinoma.

#### **Immunohistochemical staining of antibodies 103/51 and 58/47-69 on different tissues**

We investigated the expression of CFR-1 in other cancerous and normal tissues by immunohistochemical staining of paraffin sections with antibodies 103/51 and 58/47-69. Out of 15 cancerous tissues (different from stomach carcinoma), antibody 103/51

showed staining in 13 cases (Fig. 6, Tab. 1a). Negative staining was observed on anaplastic cells of the lung, confirming the results from the immunohistochemical staining and MTT-assay with the cell lines Colo-699 and EPLC-272H. This data indicates an overexpression of CFR-1 and distribution to the cell membrane in malignant transformed cells. On 28 normal tissues tested, we found a restricted expression only on three intestinal organs (Tab. 1 b). Membrane staining was observed on the glandular foveola of the stomach and the glomerular and fascicular zones of the adrenal gland, while staining of the Golgi apparatus was found in the collecting tubes of the kidney (Fig. 5). This further confirms the characterization of the antigen as CFR-1, that has been described earlier by Burrus et al. (1992, Mol. Cell Biol. 12:5600-5609).

#### **Stimulation with human and murine monoclonal antibodies**

As stated in our previous publications (Vollmers *et al.*, 1994, Cancer 74:1525-1532; Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235), the antibody 103/51 leads to the stimulation of cell line 23132 *in vitro*. We measured this stimulation of antibody 103/51 using the mitochondrial hydroxylase assay (MTT), which is a standard assay for proliferation (Carmichael *et al.*, 1987, Cancer Res. 47:936-942). To further investigate the stimulating properties of antibody 103/51, we incubated the cell line 23132 with various concentrations of purified antibody. We found a concentration-dependent stimulation with the highest activity at 4 µg/ml (Fig. 7 a). Higher concentrations showed a slight decrease in stimulation.

To test if the murine antibody 58/47-69 has the same effects on cell growth, we performed the MTT-stimulation assay with purified antibodies in comparable amounts. As it can be seen in Fig. 7 b, both antibodies lead to the stimulation of cell line 23132 *in vitro*. This further confirms identical specificity of both antibodies.

To confirm that the stimulation of antibody 103/51 and the murine antibody 58/47-69 is mediated by binding to CFR-1, we transfected cells with control vector pHOOK-2 and CFR-1 antisense vector and tested transfected cells in the MTT-assay. As a positive control for transfection, cells were also transfected with pHOOK-2-lacZ vector followed by β-galactosidase staining (data not shown). Since comparable



stimulation was observed in nontransfected cells and cells transfected with control vector pHOOK-2, a reduction of the stimulating effect of both antibodies by the transfection procedure can be excluded. In contrast, cells transfected with CFR-1 antisense vector clearly show a reduced stimulation (Fig. 7 c).

5

Finally, to demonstrate that the stimulation by antibody 103/51 is not mediated by receptors other than CFR-1, we performed a MTT-stimulation assay with cell line the 23132 and compared it with the CFR-1-negative lung carcinoma cell lines Colo-699 and EPLC-272H. While the cell line 23132 is stimulated as described above, the two  
10 lung carcinoma cell lines do not show any stimulation by antibody 103/51 (Fig. 7 d), confirming the results observed in the immunohistochemistry.

## **Patent Claims**

What is claimed is:

1. Receptor on the surface membrane of strongly proliferating cells, particularly of gastric carcinoma, which is made up of glycoproteins,  
**characterized in that** at least one determinant of the glycoprotein corresponds to a determinant of the CFR-1 protein; and the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 (IgM) binds specifically to the glycoprotein.
2. Receptor according to Claim 1,  
**characterized in that** the specific binding site on the glycoprotein is a carbohydrate residue (= sugar residue).
3. Receptor according to Claim 1,  
**characterized in that** the primary amino acid sequence of the glycoprotein corresponds at least 80% to that of CFR-1 (is homologous).
4. Receptor according to Claim 1,  
**characterized in that** the determinants of the glycoprotein have the amino acid sequence reproduced in Appendix S, cell line 23132.
5. Receptor according to one of Claims 1 to 4,  
**characterized by** a molecular mass of approximately 130 kD.
6. Use of the receptor according to one of the preceding claims,  
**characterized in that** the receptor is administered *in vivo* to induce the formation of antibodies.
7. Use of the receptor according to one of the preceding claims for the treatment of tumors,  
**characterized in that** the receptor is administered before (for prophylaxis) or with the outbreak of the illness (for therapy).

8. Use of the receptor according to one of the preceding claims for the treatment of the following tumors: esophagus, stomach, intestine, rectum, liver, gallbladder, pancreas, lung, bronchi, breast, cervix, prostate, cardiac, Barrett's, ovary, and/or uterus.

9. Use of the receptor according to one of the preceding claims for the treatment of the following tumor precursors:

of the stomach:

- dysplasia of the gastric mucosa
- intestinal metaplasia of the stomach
- *Helicobacter pylori*-associated gastritis
- tubular and tubulovillous adenoma of the stomach

of the large intestine:

- tubular adenoma of the colon
- villous adenoma of the colon
- dysplasia in ulcerative colitis

in the esophagus:

- Barrett's dysplasia of the esophagus
- Barrett's metaplasia of the esophagus

of the cervix:

- cervical intraepithelial neoplasia I
- cervical intraepithelial neoplasia II
- cervical intraepithelial neoplasia III

of the lungs:

- squamous epithelial metaplasia of the bronchus
- squamous epithelial dysplasia of the bronchus.

10. Use of the receptor according to one of the preceding claims for diagnostic purposes,  
**characterized in that** evidence for the existence, the localization, and/or the quantity of the corresponding antibodies and/or receptors is obtained via the ability of antibodies to bind to the receptor.
11. Use according to Claim 10,  
**characterized in that** the antibodies are tumor antibodies.
12. Use according to Claim 10,  
**characterized in that** the receptor is a tumor marker.
13. Method of extracting the receptor according to one of the preceding claims,  
**characterized by** the following steps:
- a) preparation of membrane proteins from cells of the human adenocarcinoma cell line 23132
  - b) performing size exclusion chromatography and
  - c) anion exchange chromatography and
  - d) finally extraction through preparative SDS-PAGE.
14. Murine mouse antibody 58/47-69 for use in one of the preceding claims and a structure which is characterized by the following features:  
the variable region of the heavy chain is homologous to IGHV 1S 125\* 01 according to Appendix A, the D segment being homologous to IGHD-ST 4\*01 and the J segment being homologous to IGHJ4\*01, and the variable region of the light chain has a structure according to Appendix B, which is homologous to IGKV-17\*01, the J segment being homologous to IGKJ2\*01.

15. Method of producing an antitumor agent using receptors according to one of the preceding claims,

**characterized in that** a compound with potential antitumor activity is tested for its ability to specifically bind to receptors according to one of the preceding claims and, in the event of a positive result, this compound is formulated for pharmaceutical administration and provided with typical additives for this purpose.

16. Method of producing an antitumor agent using receptors according to Claim 15,

**characterized in that** the compounds are human antibodies and/or mouse antibodies and/or humanized mouse antibodies and/or Fab and F(ab)<sub>2</sub> and Fab' fragments and/or single strand antibodies and/or tetrameric and/or dimeric antibody forms and/or bispecific antibodies.

## **Abstract of the Disclosure**

### **Receptor, its use, and mouse antibody**

A receptor on the surface membrane of strongly proliferating cells, particularly of gastric carcinoma, which is constructed from glycoproteins, at least one determinant of the glycoprotein corresponding to a determinant of the CFR-1 protein and the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 (IgM) specifically binding on the glycoprotein.

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad

Prof. Dr. Vollmers, Heinz

Dr. Hensel, Frank

<112> Receptor, its use, and mouse antibody

<141> 03/09/02

<211> 288 bp

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<220> sequence of the variable region of the heavy chain (V<sub>H</sub>) of the antibody  
NM58-49/69

<221> V region

<222> (1)... (288)

<400>

```

tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act gac tac tat ata aac tgg gtg aag cag
agg      60
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln
Arg
1          5          10          15
20

act gga cag ggc ctt gag tgg att gga gag att tat cct gga agt ggt aat act tac
tac
Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr
Tyr
          25          30          35
40

aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc
tac
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
Tyr
          45          50          55
60

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt gca aga tcg
gga
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser
Gly
          50          55          60
65

```

tta cga ccc tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc  
Leu Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr  
70 75 80

288



<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad

Prof. Dr. Vollmers, Heinz

Dr. Hensel, Frank

<112> Receptor, its use, and mouse antibody

<141> 03/09/02

<211> 315 bp

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<220> sequence of the variable region of the light chain (V<sub>L</sub>) of the antibody  
NM58-49/69

<221> V region

<222> (1)...(315)

<400>

```

cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt
cag      60
Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
Gln
1          5          10          15
20

agc att gta cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc
cag     120
Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
Gln
          25          30          35
40

tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg
ttc     180
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
Phe
          45          50          55
60

agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag
gat     240
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
Asp
          65          70          75
80

```

```

ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg
acc      300
Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
Thr
      85                      90                      95
100

aag ctg gaa ata aaa
315
Lys Leu Glu Ile Lys
      105

```

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad

Prof. Dr. Vollmers, Heinz

Dr. Hensel, Frank

<112> Receptor, its use, and mouse antibody

<141> 03/09/02

<211> 3114

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> cystine-rich FGF receptor of the gastric carcinoma cell line 23132

<221> CDS

<222> (450)... (3563)

<400>

450	GAT GTG AGG GAG CCT GAA AAT GAA ATT TCT TCA GAC TGC AAT CAT TTG TTG	
	TGG AAT TAT	509
	Asp Val Arg Glu Pro Glu Asn Glu Ile Ser Ser Asp Cys Asn His Leu Leu	
Trp Asn Tyr		
	143 145 150 155	
160		
	AAG CTG AAC CTA ACT ACA GAT CCC AAA TTT GAA TCT GTG GCC AGA GAG GTT	
	TGC AAA TCT	569
	Lys Leu Asn Leu Thr Thr Asp Pro Lys Phe Glu Ser Val Ala Arg Glu Val	
Cys Lys Ser		
	165 170 175	
180		
	ACT ATA ACA GAG ATT GAA GAA TGT GCT GAT GAA CCG GTT GGA AAA GGT TAC	
	ATG GTT TCC	629
	Thr Ile Thr Glu Ile Glu Glu Cys Ala Asp Glu Pro Val Gly Lys Gly Tyr	
Met Val Ser		
	185 190 195	
200		
	TGC TTG GTG GAT CAC CGA GGC AAC ATC ACT GAG TAT CAG TGT CAC CAG TAC	
	ATT ACC AAG	689
	Cys Leu Val Asp His Arg Gly Asn Ile Thr Glu Tyr Gln Cys His Gln Tyr	
Ile Thr Lys		
	205 210 215	
220		

ATG ACG GCC ATC ATT TTT AGT GAT TAC CGT TTA ATC TGT GGC TTC ATG GAT			
GAC TGC AAA			749
Met Thr Ala Ile Ile Phe Ser Asp Tyr Arg Leu Ile Cys Gly Phe Met Asp			
Asp Cys Lys			
225	230	235	
240			
AAT GAC ATC AAC ATT CTG AAA TGT GGC AGT ATT CGG CTT GGA GAA AAG GAT			
GCA CAT TCA			809
Asn Asp Ile Asn Ile Leu Lys Cys Gly Ser Ile Arg Leu Gly Glu Lys Asp			
Ala His Ser			
245	250	255	
260			
CAA GGT GAG GTG GTA TCA TGC TTG GAG AAA GGC CTG GTG AAA GAA GCA GAA			
GAA AGA GAA			869
Gln Gly Glu Val Val Ser Cys Leu Glu Lys Gly Leu Val Lys Glu Ala Glu			
Glu Arg Glu			
265	270	275	
280			
CCC AAG ATT CAA GTT TCT GAA CTC TGC AAG AAA GCC ATT CTC CGG GTG GCT			
GAG CTG TCA			929
Pro Lys Ile Gln Val Ser Glu Leu Cys Lys Lys Ala Ile Leu Arg Val Ala			
Glu Leu Ser			
285	290	295	
300			
TCG GAT GAC TTT CAC TTA GAC CGG CAT TTA TAT TTT GCT TGC CGA GAT GAT			
CGG GAG CGT			989
Ser Asp Asp Phe His Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ala Cys Arg Asp Asp			
Arg Glu Arg			
305	310	315	
320			
TTT TGT GAA AAT ACA CAA GCT GGT GAG GGC AGA GTG TAT AAG TGC CTC TTT			
AAC CAT AAA			104
Phe Cys Glu Asn Thr Gln Ala Gly Glu Gly Arg Val Tyr Lys Cys Leu Phe			
Asn His Lys			
325	330	335	
340			
TTT GAA GAA TCC ATG AGT GAA AAG TGT CGA GAA GCA CTT ACA ACC CGC CAA			
AAG CTG ATT			110
Phe Glu Glu Ser Met Ser Glu Lys Cys Arg Glu Ala Leu Thr Thr Arg Gln			
Lys Leu Ile			
345	350	355	
360			
GCC CAG GAT TAT AAA GTC AGT TAT TCA TTG GCC AAA TCC TGT AAA AGT GAC			
TTG AAG AAA			116
Ala Gln Asp Tyr Lys Val Ser Tyr Ser Leu Ala Lys Ser Cys Lys Ser Asp			
Leu Lys Lys			
365	370	375	
380			

TAC CGG TGC AAT GTG GAA AAC CTT CCG CGA TCG CGT GAA GCC AGG CTC TCC	122
TAC TTG TTA	
Tyr Arg Cys Asn Val Glu Asn Leu Pro Arg Ser Arg Glu Ala Arg Leu Ser	
Tyr Leu Leu	
385 390 395	
400	
ATG TGC CTG GAG TCA GCT GTA CAC AGA GGG CGA CAA GTC AGC AGT GAG TGC	128
CAG GGG GAG	
Met Cys Leu Glu Ser Ala Val His Arg Gly Arg Gln Val Ser Ser Glu Cys	
Gln Gly Glu	
405 410 415	
420	
ATG CTG GAT TAC CGA CGC ATG TTG ATG GAA GAC TTT TCT CTG AGC CCT GAG	134
ATC ATC CTA	
Met Leu Asp Tyr Arg Arg Met Leu Met Glu Asp Phe Ser Leu Ser Pro Glu	
Ile Ile Leu	
425 430 435	
440	
AGC TGT CGG GGG GAG ATT GAA CAC CAT TGT TCC GGA TTA CAT CGA AAA GGG	140
CGG ACC CTA	
Ser Cys Arg Gly Glu Ile Glu His His Cys Ser Gly Leu His Arg Lys Gly	
Arg Thr Leu	
445 450 455	
460	
CAC TGT CTG ATG AAA GTA GTT CGA GGG GAG AAG GGG AAC CTT GGA ATG AAC	146
TGC CAG CAG	
His Cys Leu Met Lys Val Val Arg Gly Glu Lys Gly Asn Leu Gly Met Asn	
Cys Gln Gln	
465 470 475	
480	
GCG CTT CAA ACA CTG ATT CAG GAG ACT GAC CCT GGT GCA GAT TAC CGC ATT	152
GAT CGA GCT	
Ala Leu Gln Thr Leu Ile Gln Glu Thr Asp Pro Gly Ala Asp Tyr Arg Ile	
Asp Arg Ala	
485 490 495	
500	
TTG AAT GAA GCT TGT GAA TCT GTA ATC CAG ACA GCC TGC AAA CAT ATA AGA	158
TCT GGA GAC	
Leu Asn Glu Ala Cys Glu Ser Val Ile Gln Thr Ala Cys Lys His Ile Arg	
Ser Gly Asp	
505 510 515	
520	
CCA ATG ATC TTG TCG TGC CTG ATG GAA CAT TTA TAC ACA GAG AAG ATG GTA	164
GAA GAC TGT	
Pro Met Ile Leu Ser Cys Leu Met Glu His Leu Tyr Thr Glu Lys Met Val	
Glu Asp Cys	
525 530 535	
540	

GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG CAG TAT TTC ATC TCC CGG GAT TGG AAG CTG	170
GAC CCT GTC	
Glu His Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu	
Asp Pro Val	
545 550 555	
560	
CTG TAC CGC AAG TGC CAG GGA GAC GCT TCT CGT CTT TGC CAC ACC CAC GGT	176
TGG AAT GAG	
Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His Thr His Gly	
Trp Asn Glu	
565 570 575	
580	
ACC AGC GAA TTT ATG CCT CAG GGA GCT GTG TTC TCT TGT TTA TAC AGA CAC	182
GCC TAC CGC	
Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His	
Ala Tyr Arg	
585 590 595	
600	
ACT GAG GAA CAG GGA AGG AGG CTC TCA CGG GAG TGC CGA GCT GAA GTC CAA	188
AGG ATC CTA	
Thr Glu Glu Gln Gly Arg Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln	
Arg Ile Leu	
605 610 615	
620	
CAC CAG CGT GCC ATG GAT GTC AAG CTG GAT CCT GCC CTC CAG GAT AAG TGC	194
CTG ATT GAT	
His Gln Arg Ala Met Asp Val Lys Leu Asp Pro Ala Leu Gln Asp Lys Cys	
Leu Ile Asp	
625 630 635	
640	
CTG GGA AAA TGG TGC AGT GAG AAA ACA GAG ACT GGA CAG AAG CTG GAG TGC	200
CTT CAG GAC	
Leu Gly Lys Trp Cys Ser Glu Lys Thr Glu Thr Gly Gln Lys Leu Glu Cys	
Leu Gln Asp	
645 650 655	
660	
CAT CTG GAT GAC TTA GTG GTG GAG TGT AGA GAT ATA GTT GGC AAC CTC ACT	206
GAG TTA GAA	
His Leu Asp Asp Leu Val Val Glu Cys Arg Asp Ile Val Gly Asn Leu Thr	
Glu Leu Glu	
665 670 675	
680	
TCA GAG GAT ATT CAA ATA GAA GCC TTG CTG ATG AGA GCC TGT GAG CCC ATA	212
ATT CAG AAC	
Ser Glu Asp Ile Gln Ile Glu Ala Leu Leu Met Arg Ala Cys Glu Pro Ile	
Ile Gln Asn	
685 690 695	
700	

TTC TGC CAC GAT GTG GCA GAT AAC CAG ATA GAC TCC GGG GAC CTG ATG GAG	218
TGT CTG ATA	
Phe Cys His Asp Val Ala Asp Asn Gln Ile Asp Ser Gly Asp Leu Met Glu	
Cys Leu Ile	
705 710 715	
720	
CAG AAC AAA CAC CAG AAG GAC ATG AAC GAG AAG TGT GCC ATC GGA GTT ACC	224
CAC TTC CAG	
Gln Asn Lys His Gln Lys Asp Met Asn Glu Lys Cys Ala Ile Gly Val Thr	
His Phe Gln	
725 730 735	
740	
CTG GTG CAG ATG AAG GAT TTT CGG TTT TCT TAC AAG TTT AAA ATG GCC TGC	230
AAG GAG GAC	
Leu Val Gln Met Lys Asp Phe Arg Phe Ser Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys	
Lys Glu Asp	
745 750 755	
760	
GTG TTG AAG CTT TGC CCA AAC ATA AAA AAG AAG GTG GAC GTG GTG ATC TGC	236
CTG AGC ACG	
Val Leu Lys Leu Cys Pro Asn Ile Lys Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys	
Leu Ser Thr	
765 770 775	
780	
ACC GTG CGC AAT GAC ACT CTG CAG GAA GCC AAG GAG CAC AGG GTG TCC CTG	242
AAG TGC CGC	
Thr Val Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu	
Lys Cys Arg	
785 790 795	
800	
AGG CAG CTC CGT GTG GAG GAG CTG GAG ATG ACG GAG GAC ATC CGC TTG GAG	248
CCA GAT CTA	
Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile Arg Leu Glu	
Pro Asp Leu	
805 810 815	
820	
TAC GAA GCC TGC AAG AGT GAC ATC AAA AAC TTC TGT TCC GCT GTG CAA TAT	254
GGC AAC GCT	
Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr	
Gly Asn Ala	
825 830 835	
840	
CAG ATT ATC GAA TGT CTG AAA GAA AAC AAG AAG CAG CTA AGC ACC CGC TGC	260
CAC CAA AAA	
Gln Ile Ile Glu Cys Leu Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg Cys	
His Gln Lys	
845 850 855	
860	

GTA TTT AAG CTG CAG GAG ACA GAG ATG ATG GAC CCA GAG CTA GAC TAC ACC			
CTC ATG AGG			266
Val Phe Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr			
Leu Met Arg			
865	870	875	
880			
GTC TGC AAG CAG ATG ATA AAG AAG TTC TGT CCG GAA GCA GAT TCT AAA ACC			
ATG TTG CAG			272
Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Lys Phe Cys Pro Glu Ala Asp Ser Lys Thr			
Met Leu Gln			
885	890	895	
900			
TGC TTG AAG CAA AAT AAA AAC AGT GAA TTG ATG GAT CCC AAA TGC AAA CAG			
ATG ATA ACC			278
Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln			
Met Ile Thr			
905	910	915	
920			
AAG CGC CAG ATC ACC CAG AAC ACA GAT TAC CGC TTA AAC CCC ATG TTA AGA			
AAA GCC TGT			284
Lys Arg Gln Ile Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg			
Lys Ala Cys			
925	930	935	
940			
AAA GCT GAC ATT CCT AAA TTC TGT CAC GGT ATC CTG ACT AAG GCC AAG GAT GAT			
TCA GAA 2909			
Lys Ala Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp			
Ser Glu			
945	950	955	960
TTA GAA GGA CAA GTC ATC TCT TGC CTG AAG CTG AGA TAT GCT GAC CAG CGC CTG			
TCT TCA 2969			
Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala Asp Gln Arg Leu			
Ser Ser			
965	970	975	980
GAC TGT GAA GAC CAG ATC CGA ATC ATT ATC CAG GAG TCC GCC CTG GAC TAC CGC			
CTG GAT 3029			
Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg			
Leu Asp			
985	990	995	
1000			
CCT CAG CTC CAG CTG CAC TGC TCA GAC GAG ATC TCC AGT CTA TGT GCT GAA GAA			
GCA GCA 3089			
Pro Gln Leu Gln Leu His Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu			
Ala Ala			
1005	1010	1015	
1020			



GCC CAA GAG CAG ACA GGT CAG GTG GAG GAG TGC CTC AAG GTC AAC CTG CTC AAG  
 ATC AAA 3149  
 Ala Gln Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys  
 Ile Lys  
 1025 1030 1035  
 1040

ACA GAA TTG TGT AAA AAG GAA GTG CTA AAC ATG CTG AAG GAA AGC AAA GCA GAC  
 ATC TTT 3209  
 Thr Glu Leu Cys Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu Ser Lys Ala Asp  
 Ile Phe  
 1045 1050 1055  
 1060

GTT GAC CCG GTA CTT CAT ACT GCT TGT GCC CTG GAC ATT AAA CAC CAC TGC GCA  
 GCC ATC 3269  
 Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala  
 Ala Ile  
 1065 1070 1075  
 1080

ACC CCT GGC CGC GGG CGT CAA ATG TCC TGT CTC ATG GAA GCA CTG GAG GAT AAG  
 CGG GTG 3329  
 Thr Pro Gly Arg Gly Arg Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys  
 Arg Val  
 1085 1090 1095  
 1100

AGG TTA CAG CCC GAG TGC AAA AAG CGC CTC AAT GAC CGG ATT GAG ATG TGG AGT  
 TAC GCA 3389  
 Arg Leu Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser  
 Tyr Ala  
 1105 1110 1115  
 1120

GCA AAG GTG GCC CCA GCA GAT GGC TTC TCT GAT CTT GCC ATG CAA GTA ATG ACG  
 TCT CCA 3449  
 Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met Gln Val Met Thr  
 Ser Pro  
 1125 1130 1135  
 1140

TCT AAG AAC TAC ATT CTC TCT GTG ATC AGT GGG AGC ATC TGT ATA TTG TTC CTG  
 ATT GGC 3509  
 Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu  
 Ile Gly  
 1145 1150 1155  
 1160

CTG ATG TGT GGA CGG ATC ACC AAG CGA GTG ACA CGA GAG CTC AAG GAC AGG TAG  
 3563  
 Leu Met Cys Gly Arg Ile Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu LysA Asp Arg  
 \*\*\*  
 1165 1170 1175 1179